

**Nye stoffer med effekt på immunsystemet  
isolert fra sårhelende planter i Mali  
Polysakkarider fra *Combretum glutinosum***

**Etnofarmakologiske studier i Mali med  
fokus på viktige medisinsplanter  
Kolokani og Dioila  
*Combretum glutinosum***



**Kristin Marynia Sagberg  
Hovedfagsoppgave for graden cand.pharm.  
Avdeling for Farmasøytisk kjemi  
Farmasøytisk institutt  
Det matematisk-naturvitenskapelig fakultet  
Universitetet i Oslo  
Høst 2006**

**SÅRHELENDE PLANTER I MALI**  
*Combretum glutinosum*

**STRUKTUR OG AKTIVITETSSTUDIER AV  
POLYSAKKARIDER**

**FELTARBEID I KOLOKANI OG DIOILA**

**Hovedfagsoppgave i farmasi for graden cand.pharm.  
Avdeling for Farmasøytisk kjemi  
Farmasøytisk institutt  
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet  
Universitetet i Oslo**

**Kristin Marynia Sagberg  
Oslo, november 2006**

**Veiledere  
Professor Berit Smestad Paulse  
Professor Drissa Diallo  
Stipendiat Kari T. Inngjerdingen**

# FORORD

Denne hovedfagsoppgaven ble utført ved Avdeling for Farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo i tidsrommet november 2005 til november 2006. En del av arbeidet foregikk på feltarbeid og ved Département de Médecines Traditionnelles i Mali i januar, februar og mars 2006, under veiledning av professor Drissa Diallo.

Takk rettes til:

Professor Berit Smestad Paulsen for all praktisk og teoretisk veiledning under arbeidet med oppgaven.

Professor Drissa Diallo for planlegging og veiledning i forbindelse med felt- og laboratoriearbeid i Mali.

Stipendiat Kari Inngjerdingen for uvurderlige praktiske råd og hjelp på laboratoriet.

Stipendiat Adiratou Togola og Sekou Bah for hjelp og tips på laboratoriet.

Terje E. Michaelsen for veiledning og tilrettelegging i forbindelse med utførelse av komplementfikseringstesten ved Det Norsk Folkehelseinstitutt.

Finn Tønnesen for å ha utført GC-MS-analysene.

Anders Rusten og Annette Theis for hyggelig reisefølge og samboerskap i Mali, samt hjelp og selskap på laboratoriet.

Tom Erik Grønhaug for IT-hjelp i forbindelse med oppgaveskriving.

Alle på avdeling Farmasøytisk kjemi for hjelpsomhet, og et hyggelig og lærerikt hovedfagsår.

Øyvind Gard for all støtte og tålmodighet, med tanke på lange dager på labben, stadige avtaleendringer og mye papirrot og annet rot hjemme.

Mor og far for alltid å stille opp når jeg trenger det, blant annet med hjelp til praktiske ting som stadig måtte utsettes på grunn av laboratoriearbeid, samt for å ha bidratt så jeg fikk muligheten til å reise til Mali.

Jeg vil også takke alle ved Département de Médecines Traditionnelles (DMT) for å ha tatt så godt imot meg og gjort oppholdet i Mali til en uforglemmelig og fantastisk opplevelse i forbindelse med felt- og laboratoriearbeid.

En spesielle takk rettes til

Professor Drissa Diallo for planlegging og veiledning i forbindelse med felt- og laboratoriearbeid i Mali.

N’Golo Ballo for hjelp og reisefølge i forbindelse med feltarbeid, samt vennskap og hyggelige stunder i DMTs hage med blant annet malisk kultur, franskpraktisering og hagearbeid.

Famolo Diarra og Fagnan Sanogo for hjelp med laboratoriearbeid.

Aminata Tounkara for hjelp og reisefølge i forbindelse med feltarbeid.

Alle farmasistudentene for hjelp og selskap på laboratoriet.

Yacouba Ouologuème for hyggelige stunder i DMTs hage.

Doumbia for å ha utført en fantastisk jobb som sjåfør.

Je voudrais également remercier tous a DMT pour m’avoir accueilli aussi chaleureusement que mon séjour avec le travail a Mali m’a offert une expérience inoubliable et fantastique.

Je voudrais en particulier donner mes remerciements a

Professeur Drissa Diallo pour le planning et les conseils autour de travail au terrain et au laboratoire a Mali.

N’Golo Ballo pour l’aide et l’accompagnement pendant le travail au terrain ainsi que l’amitié et des journées sympas au jardin de DMT en apprenant a connaitre la culture malienne, en pratiquant la langue française et en jardinant un peu.

Yacouba Ouologuème pour des journées sympas au jardin de DMT.

Famolo Diarra et Fagnan Sanogo pour l’aide avec le travail au laboratoire.

Aminata Tounkara pour l’aide et l’accompagnement de travail au terrain.

Tous les étudiants de pharmacie pour l’aide et l’unité au laboratoire.

Doumbia pour le travail fantastique en tant que chauffeur.

Oslo, november 2006

Kristin Marynia Sagberg

# INNHALDSFORTEGNELSE

<b>1. Forkortelser.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Sammendrag.....</b>	<b>4</b>
<b>3. Innledning.....</b>	<b>9</b>
<b>3.1 Polysakkarider.....</b>	<b>9</b>
3.1.1 Strukturelle polysakkarider i planter.....	9
3.1.1.1 Plantecellevegg.....	9
3.1.1.2 Polysakkarider i plantecelleveggen.....	10
<b>3.2 Polysakkarider og immunologisk aktivitet.....</b>	<b>15</b>
3.2.1 Komplementsystemet.....	15
3.2.2 Struktur og aktivitet hos pektiner.....	17
<b>3.3 Etnofarmakologi.....</b>	<b>19</b>
<b>3.4 Tradisjonell medisin i Mali.....</b>	<b>20</b>
<b>3.5 Combretum glutinosum (Perr ex DC).....</b>	<b>22</b>
3.5.1 Taksonomisk klassifisering.....	23
3.5.2 Beskrivelse av planten og dens habitat.....	23
3.5.3 Tradisjonell medisinsk bruk av <i>C. glutinosum</i> .....	23
3.5.4 Tidligere forskning på <i>C. glutinosum</i> .....	24
3.5.5 Tidligere forskning på andre arter av <i>Combretum</i> .....	25
<b>4. Metoder.....</b>	<b>29</b>
<b>4.1 Generelle metoder.....</b>	<b>30</b>
4.1.1 Vannkvalitet.....	30
4.1.2 Innveing.....	30
4.1.3 Filtrering.....	30
4.1.4 Evakuering av luft.....	31
4.1.5 Oppkonsentrering.....	31
4.1.6 Vask av dialyseslanger.....	31
4.1.7 Dialyse.....	32
4.1.8 Frysetørring.....	32
4.1.9 Sentrifugering.....	34
4.1.10 Blanding av løsninger.....	35
4.1.11 Syrevask av glassutstyr.....	35
4.1.12 pH-målinger.....	36
4.1.13 Absorbansmålinger.....	36
<b>4.2 Isolering av polysakkarider.....</b>	<b>37</b>
4.2.1 Preparering av plantemateriale.....	37
4.2.2 Ekstraksjon med organiske løsemidler.....	37
4.2.3 Ekstraksjon med vann.....	38
4.2.4 Gelfiltrering.....	39
4.2.4.1 Biogel P6.....	40
4.2.4.2 Sephacryl S-400 HR.....	41
4.2.4.2.1 Metode benyttet på store blader.....	41
4.2.4.2.2 Metode benyttet på små blader.....	42
4.2.4.3 PD-10.....	43

4.2.5 Ionebytterkromatografi.....	44
4.2.5.1 DEAE Sepharose Fast Flow.....	44
<b>4.3 Kvantitative og kvalitative tester på karbohydratinnhold.....</b>	<b>46</b>
4.3.1 Monosakkaridbestemmelse.....	46
4.3.1.1 Metanolyse.....	46
4.3.1.2 TMS-derivatisering.....	47
4.3.1.3 Gasskromatografi.....	49
4.3.2 Fenol-svovelsyretest.....	51
<b>4.4 Strukturoppklaring.....</b>	<b>53</b>
4.4.1 Karboksylsyre-reduksjon.....	53
4.4.2 Metylering.....	55
4.4.3 Hydrolyse.....	57
4.4.4 Reduksjon.....	58
4.4.5 Acetylering.....	59
4.4.6 GC-MS.....	60
4.4.7 Bestemmelse av metanol- og eddiksyreinnhold.....	61
4.4.8 IR-spektroskopi.....	63
4.4.9 Enzymatisk degradering av pektin. Deesterifisering med NaOH og galactoronanasebehandling.....	64
<b>4.5 Molekylvektbestemmelse.....</b>	<b>67</b>
4.5.1 FPLC med Superose 6.....	67
<b>4.6 Biologisk aktivitet.....</b>	<b>69</b>
4.6.1 Komplementfikseringstesten.....	69
<b>4.7 Feltarbeid i Mali.....</b>	<b>74</b>
4.7.1 Etnofarmakologisk studie; healerintervjuer.....	74
4.7.2 Innsamling av plantemateriale.....	75
 <b>5. Resultater og diskusjon, små blader.....</b>	 <b>76</b>
<b>5.1 Isolering av og analyser utført på råekstrakter.....</b>	<b>76</b>
5.1.1 Ekstraksjon med vann.....	76
5.1.2 Metanolyse og GC på råekstrakter.....	76
5.1.3 Biologisk aktivitet.....	78
5.1.3.1 Komplementfikseringstesten.....	78
<b>5.2 Separasjon på Biogel P-6 og analyser på nye fraksjoner.....</b>	<b>80</b>
<b>5.3 Separasjon på DEAE Sepharose Fast Flow og analyser på nye fraksjoner..</b>	<b>81</b>
5.3.1 Kvantitativ og kvalitativ bestemmelse av monosakkaridinnhold.....	83
5.3.1.1 Metanolyse og GC.....	83
5.3.2 Biologisk aktivitet.....	85
5.3.2.1 Komplementfikseringstesten.....	85
5.3.3 Bestemmelse av molekylvekt, FPLC.....	87
5.3.4 Strukturoppklaring.....	89
5.3.4.1 Bestemmelse av bindingsforhold i fraksjonene.....	89
5.3.4.2 Bestemmelse av metanol- og eddiksyreinnhold.....	99
5.3.4.3 IR-spektroskopi.....	100
5.3.4.4 Enzymdegradering.....	100
<b>5.4 Separasjon på Sephacryl S-400 HR og analyser på nye fraksjoner.....</b>	<b>101</b>
<b>5.5 Separasjon på PD-10-kolonne og analyser på nye fraksjoner.....</b>	<b>102</b>
5.5.1 Kvantitativ og kvalitativ bestemmelse av monosakkaridinnhold.....	102
5.5.1.1 Metanolyse og GC.....	102

5.5.2 Biologisk aktivitet.....	104
5.5.2.1 Komplementfikseringstesten.....	104
5.5.3 Strukturoppklaring.....	105
5.5.3.1 Bestemmelse av bindingsforhold i fraksjonene.....	105
<b>6. Resultat og diskusjon, store blader.....</b>	<b>111</b>
6.1 Separasjon på Sephacryl og analyser på nye fraksjoner.....	111
6.1.1 Kvantitativ og kvalitativ bestemmelse av monosakkaridinnhold.....	111
6.1.1.1 Metanolyse og GC.....	112
6.1.2 Biologisk aktivitet.....	114
6.1.2.1 Komplementfikseringstesten.....	114
6.1.3 Bestemmelse av molekylvekt, FPLC.....	115
6.1.4 Strukturoppklaring.....	117
6.1.4.1 Bestemmelse av bindingsforhold i fraksjonene.....	117
6.1.4.2 Bestemmelse av metanol- og eddiksyreinnhold.....	125
6.1.4.3 IR-spektroskopi.....	125
6.1.4.4 Enzymdegradering.....	126
6.2 Separasjon på PD-10-kolonne og analyser på nye fraksjoner.....	127
6.2.1 Kvantitativ og kvalitativ bestemmelse av monosakkaridinnhold.....	127
6.2.1.1 Metanolyse og GC.....	127
6.2.2 Biologisk aktivitet.....	128
6.2.2.1 Komplementfikseringstesten.....	128
6.2.3 Strukturoppklaring.....	129
6.2.3.1 Bestemmelse av bindingsforhold i fraksjonene.....	129
<b>7. Resultater fra feltarbeid i Mali.....</b>	<b>133</b>
7.1 Healerintervjuer.....	133
7.1.1 Kolokaniområdet.....	133
7.2.2 Dioilaområdet.....	140
7.2 Innsamling av plantemateriale.....	151
<b>8. Konklusjon.....</b>	<b>152</b>
<b>9. Liste over reagenser.....</b>	<b>158</b>
<b>10. Referanser.....</b>	<b>159</b>

# 1. FORKORTELSER

$\alpha$	Alfaanomere monosakkarider der OH-gruppen ved C1 har samme konfigurasjon som sukkeret selv (D eller L)
Ac	Acetyl
AG I	Arabinogalaktan I
AG II	Arabinogalaktan II
AGP	Arabinogalaktanprotein
Ara	Arabinose
B	Betaanomere monosakkarider der OH-gruppen ved C1 har motsatt konfigurasjon som sukkeret selv (D eller L)
C1	Karbonatom nummer 1 i et monosakkarid
C2	Karbonatom nummer 2 i et monosakkarid
C3	Karbonatom nummer 3 i et monosakkarid
C4	Karbonatom nummer 4 i et monosakkarid
C6	Karbonatom nummer 6 i et monosakkarid
C	<i>Combretum</i>
CFA	Myntenhet i Mali
Cg	<i>Combretum glutinosum</i>
CgLSur <sub>2</sub>	Nytt navn på Sur <sub>2</sub> , store blader, preparert av Ringerud (2003)
CgLSur <sub>2</sub> I	Første fraksjon eluert ut på Sephasryl S-400 HR-kolonne, store blader
CgLSur <sub>2</sub> II	Andre fraksjon eluert ut på Sephasryl S-400 HR-kolonne, store blader
CgLSur <sub>2</sub> Ienz	Enzymdegradert CgLSur <sub>2</sub> II
CgLSur <sub>2</sub> III	Tredje fraksjon eluert ut på Sephasryl S-400 HR-kolonne, store blader
CMC	1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl)-carbodiimide-metho-p-toluenesulfonat (carbodiimide)
CgS50A	Fraksjon eluert ut på DEAE Sepharose® fast flow ionebytterkolonne med saltgradient, 50-graders ekstraktet, små blader
CgS50Aenz	Enzymdegradert CgS50A
CgS50AA	Fraksjon eluert ut på DEAE Sepharose® fast flow ionebytterkolonne med 2 M NaCl, 50-graders ekstraktet, små blader
CgS50N	Fraksjon eluert ut på DEAE Sepharose® fast flow ionebytterkolonne med destillert vann, 50-graders ekstraktet, små blader
CgS50Nenz	Enzymdegradert CgS50N



CgS50Rå	Vanndig ekstrakt av Cg-blader ved 50°C ekstraksjon, små blader
CgS100A	Fraksjon eluert ut på DEAE Sepharose® fast flow ionebytterkolonne med saltgradient, 100-graders vannekstraktet, små blader
CgS100Aenz	Enzymdegradert CgS100A
CgS100AA	Fraksjon eluert ut på DEAE Sepharose® fast flow ionebytterkolonne med 2 M NaCl, 100-graders vannekstraktet, små blader
CgS100N	Fraksjon eluert ut på DEAE Sepharose® fast flow ionebytterkolonne med destillert vann, 100-graders ekstraktet, små blader
CgS100PI	Første fraksjon eluert ut på Biogel P-6-kolonne, 100-graders vannekstrakt, små blader
CgS100PII	Andre fraksjon eluert ut på Biogel P-6-kolonne
CgS100PIII	Tredje fraksjon eluert ut på Biogel P-6-kolonne, 100-graders vannekstrakt, små blader
CgS100Rå COOH	Vanndig ekstrakt av Cg-blader ved 100°C ekstraksjon Syregruppe
d	Diameter
D	D-sukker med hydroksylgruppe i kiralt karbon rettet mot høyre når molekylet er tegnet i Fischer-projeksjon
Da	Dalton
DEAE	Dietylaminoetyl
DAc	esterifisert med acetyl
DMe	esterifisert med metyl
DMT	Département de Médecines Traditionnelles
<i>f</i>	Furanoseform, femring
FID	Flammeionisasjonsdetektor
Fuc	Fucose
Gal	Galaktose
Gal A	Galakturonsyre
GC	Gasskromatografi
GC-MS	Gasskromatografi-massespektrometri
Glc	Glukose
Glc A	Glukuronsyre
h	Høyde
H <sub>2</sub>	Hydrogengass

HGA	Homogalakturonan
ICH50	konsentrasjon som gir 50% hemming av hemolyse
INRSP	Institut National de Recherche en Santé Publique
IR	Infrarød
ITM	Improved Traditional Medicine
kDa	Kilodalton
L	Liter
L	L-sukker med hydroksylgruppe i kiralt karbon rettet mot venstre når molekylet er tegnet i Fischer-projeksjon
Man	Mannose
Me	Metyl
MS	Massespektrometri
Mw	Molekylvekt
MWCO	Molecular Weight Cut Off; porestørrelse i dialyseslanger
N <sub>2</sub>	Nitrogengass
O	Oksygenatom
O <sub>2</sub>	Oksyngengass
OAc	Acetylgruppe bundet til sukker via oksygen
OH	Hydroksylgruppe
OMe	Metylgruppe bundet til sukker via oksygen
<i>p</i>	Pyranoseform, seksring
PM II	<i>Plantago major</i> , polysakkaridfraksjon II
RG I	Rhamnogalakturonan I
RG II	Rhamnogalakturonan II
Rha	Rhamnose
rpm	Runder per minutt
Sur2	Andre sure fraksjon fra Rå50°C som ble eluert ut med saltgradient fra en DEAE Sepharose® fast flow ionebytterkolonne (Ringerud 2003)
T	Terminal
UV	Ultraviolet
VIS	Synlig lys (visible)
Xyl	Xylose

## 2. SAMMENDRAG

Bruk av tradisjonell medisin er et viktig bidrag til helsetilbudet i mange land, blant annet Mali i Vest-Afrika. Tradisjonelle healere besitter mye kunnskap om planter og medisinsk bruk av disse som er nyttig i etnofarmakologisk forskning. Denne oppgaven tar for seg bruk og strukturanalyser av *Combretum glutinosum*, både små og store blader.

### Små blader

Tørket og pulverisert bladmateriale kjøpt på medisinplantemarkedet i Bamako og samlet under feltarbeid i Dioila-området i Mali januar og februar 2006, ble først ekstrahert med organiske løsemidler og deretter med vann, 50°C og 100°C. Det ble jobbet videre med de to vannekstraktene som fikk navnene CgS50Rå og CgS100Rå. Komplementfikserende aktivitet ble testet hos CgS50Rå, og funnet å være god sammenliknet med *Plantago major* (PM II) som ble brukt som standard.

CgS100Rå ble separert etter synkende molekylstørrelse på Biogel P6-kolonne. Resultatet ble tre nye fraksjoner: CgS100PI, CgS100PII og CgS100PIII. På bakgrunn av resultater fra fenolsvovelsyretesten ble det bestemt å gå videre med CgS100PII. Denne ble deretter separert etter ionestyrke på DEAE Sepharose fast flow-kolonne til en nøytral (CgS100N), en sur (CgS100A) og en ekstra sur (CgS100AA) fraksjon. CgS50Rå ble også separert på DEAE Sepharose fast flow til en nøytral (CgS50N), en sur (CgS50A) og en ekstra sur (CgS50AA) fraksjon. På bakgrunn av resultater fra fenolsvovelsyretesten ble det bestemt å gå videre med CgS50N, CgS50A, CgS100N, CgS100A og CgS100AA. Fraksjonene ble dampet inn og frysetørket.

**CgS50N** består av 63,9% karbohydrat, og inneholder spesielt mye Xyl (31,3%). Fraksjonen er også rik på Glc (17,1%), Ara (8,5), Gal (8,3) og Gal A (29,1%). Xyl foreligger i all hovedsak som T Xyl, og sammen med Glc i form av 1,4 Glc kan dette stamme fra xyloglukaner. Omtrent like store mengder av 1,4 Gal A og 1,3,4 Gal A tyder på innhold av sterkt forgrenede homogalakturenankjeder. 1,4 Gal A og 1,3,4 Gal A kan også sammen med rhamnose i form av 1,2 og 1,2,4 Rha stamme fra rhamnogalakturenan I eller II. Arabinogalaktan II er også muligens tilstede. Fraksjonen har god komplementfikserende aktivitet, faktisk bedre enn PMII ved lave konsentrasjoner og omtrent lik ved høyere konsentrasjoner. Bestemmelse av

metanol- og eddiksyreinnhold og IR-spektroskopi viste at fraksjonen inneholder forestrede sukre. Fraksjonen er høymolekylær i området fra ca 300 kDa til  $\geq 475$  kDa. Etter enzymdegradering og påfølgende separasjon på PD-10-kolonne forsvant den komplementfikserende aktiviteten, og metanolyse/GC viste at den nye fraksjonen CgS50Nenz inneholdt svært lite karbohydrater. Metylering og GC-MS viste få tegn på innhold av komplementfikserende polysakkarider; homogalakturenan med lite forgreninger, stivelse eller forurensning, xyloglukaner samt muligens arabinogalakatan I.

**CgS50A** består av 58% karbohydrat, og inneholder store mengder Gal A (26,9%), Gal (18,2%), Xyl (15,7%) og Ara (14,1%). Xyl foreligger stort sett bare som T Xyl, og kan sammen med 1,4 Glc stamme fra xyloglukaner. Gal i form av 1,3,6 Gal og 1,3 Gal kan sammen med T Ara, 1,3 Ara og T Gal tyde på innhold av arabinogalakatan type II. Tilstedeværelse av 1,4 Gal A og 1,3,4 Gal A indikerer at fraksjonen kan inneholde homogalakturenankjeder med forgrening i 3-posisjon. 1,4 Gal A og 1,3,4 Gal A kan sammen med blant annet 1,2 Rha og 1,2,4 Rha også stamme fra rhamnogalakturenaner. Fraksjonen har god komplementfikserende aktivitet, omtrent lik som PMII. Bestemmelse av metanol- og eddiksyreinnhold og IR-spektroskopi viste at fraksjonen inneholder forestrede sukre. Fraksjonen er høymolekylær i området fra ca 20 til  $\geq 475$  kDa. Etter enzymdegradering og påfølgende separasjon på PD-10-kolonne forsvant den komplementfikserende aktiviteten, og metanolyse/GC viste at den nye fraksjonen CgS50Aenz inneholdt svært lite karbohydrater. Metylering og GC-MS viste få tegn på innhold av komplementfikserende polysakkarider; homogalakturenan med lite forgreninger, stivelse eller forurensning, xyloglukaner samt muligens arabinogalakatan II og rhamnogalakturenan I og/eller II.

**CgS100N** består av 21,9% karbohydrat, og inneholder spesielt mye Ara (23,2%). Fraksjonen er også rik på Xyl (14,7%), Gal (16,3%), Glc (13,7%) og Gal A (21,6%). T Xyl og 1,4 Glc kan stamme fra xyloglukaner, og 1,4 Gal A og 1,3,4 Gal A kan stamme fra homogalakturenankjeder og/eller rhamnogalakturenaner. Rhamnogalakturenaner inneholder i tillegg blant annet 1,2 Rha og 1,2,4 Rha, av hvilke den første er funnet og den andre kan skjules av en forurensningstopp. 1,3 Gal og 1,3,6 Gal tyder på arabinogalakatan II. Fraksjonen har god komplementfikserende aktivitet, omtrent som PM II, men noe lavere ved høye konsentrasjoner. Bestemmelse av metanol- og eddiksyreinnhold viste at fraksjonen inneholder forestrede sukre.

**CgS100A** består av 57,6% karbohydrat, og inneholder spesielt mye Gal (23,8%). Fraksjonen er også rik på Ara (14,4%), Rha (18,4%) og Gal A (29,3%). Store mengder 1,4 Gal A og små mengder 1,3,4 Gal A tyder på innhold av homogalakturonankjeder med lite forgreninger. Disse strukturene kan også stamme fra rhamnogalakturonan I og/eller II sammen med blant annet 1,2 Rha og 1,2,4 Rha. T Xyl og 1,4 Glc kan tyde på innhold av xyloglukaner. Fraksjonen viser en noe høyere komplementfikserende aktivitet enn PM II ved lave konsentrasjoner, men denne forskjellen jevner seg ut ved en konsentrasjon på ca 125 mikrogram/ml. Bestemmelse av metanol- og eddiksyreinnhold og IR-spektroskopi viste at fraksjonen inneholder forstrede sukre. Fraksjonen er høymolekylær i området fra ca 125 til  $\geq 475$  kDa. Etter enzymdegradering og påfølgende separasjon på PD-10-kolonne forsvant den komplementfikserende aktiviteten, og metanolyse/GC viste at den nye fraksjonen CgS100Aenz inneholdt svært lite karbohydrater. Metylering og GC-MS viste få tegn på innhold av komplementfiserende polysakkarider; xyloglukaner, stivelse eller forurensning samt muligens arabinogalaktan II.

**CgS100AA** består av 31,3% karbohydrat, og er rik på Ara (18,8%), Xyl (19,1%), Gal (13,6%), Glc (11,7%) og Gal A (28,3%). Ganske store mengder T Xyl kan sammen med 1,4 Glc stamme fra xyloglukaner. 1,4 Glc A og 1,3,4 Glc A tyder på innhold av homogalakturonan, og/eller rhamnogalakturonan I og/eller II sammen med rhamnose og eventuelt T Ara. Den komplementfikserende aktiviteten er tilsvarende som hos CgS100N. Bestemmelse av metanol- og eddiksyreinnhold viste at fraksjonen inneholder forestrede sukre. Fraksjonen er høymolekylær med molekylvekt på  $\geq 450$  kDa.

### Store blader

Det ble jobbet videre med materiale preparert av Anne Marthe Ringerud (2003). Fraksjonen ble omdøpt fra Sur2 til CgLSur<sub>2</sub>. En mengde av stoffet ble separert etter synkende molekylstørrelse på Sephacryl S-400 HR-kolonne. På bakgrunn av resultatene fra fenolsvovelsyretesten ble de eluerte fraksjonene samlet til tre større fraksjoner; CgLSur<sub>2</sub>I, CgLSur<sub>2</sub>II og CgLSur<sub>2</sub>III. Fraksjonene ble dampet inn og frysetørket.

**CgLSur<sub>2</sub>I** består av 35,8% karbohydrat, og inneholder spesielt mye Xyl (42,3%). Fraksjonen er også rik på Ara (10,4), Gal (17,2) og Gal A (12,6%). Xyl foreligger i all hovedsak som

T Xyl, og sammen med Glc i form av 1,4 Glc kan dette stamme fra xyloglukaner. 1,3,6 Gal, 1,3 Gal og T Ara kan stamme fra arabinogalaktan II. Noe 1,4 Gal A og 1,3,4 Gal A tyder på innhold av forgrenede homogalakturonankjeder og/eller rhamnogalakturonan, sistnevnte sammen med T Ara, T Rha og 1,2 Rha (RG II) eller 1,2 Rha og 1,2,4 Rha (RG I). Fraksjonen har god komplementfikserende aktivitet, faktisk bedre enn PMII ved lave konsentrasjoner og omtrent like ved høyere konsentrasjoner. Bestemmelse av metanol- og eddiksyreinnhold og IR-spektroskopi viste at fraksjonen inneholder forestrede sukre. Fraksjonen er høymolekylær med molekylvekt  $\geq 475$  kDa.

**CgLSur<sub>2</sub>II** består av 67,2% karbohydrat, og er rik på Xyl (17,7%), Ara (12,4%), Gal (19,4%) og Gal A (31,2%). Ut fra den store mengden 1,4 Gal A og en mindre mengde 1,3,4 Gal A er det sannsynlig at fraksjonen inneholder en del lite forgrenet homogalakturonan. 1,4 Gal A og 1,3,4 Gal A kan også stamme fra rhamnogalakturonan I eller II, sammen med henholdsvis 1,2 Rha og 1,2,4 Rha, og 1,2 Rha, T Rha og T Ara. Xyl kan komme fra både xylaner og xyloglukaner. Fra den første i form av 1,4 Xyl og sammen med 1,2,4 Xyl som muligens er tilstede, og fra den andre i form av T Xyl og sammen med blant annet 1,4 Glc. Gal i form av 1,3,6 Gal og 1,3 Gal, og Ara i form av T Ara og 1,3 Ara tyder på innhold av arabinogalaktan II. Fraksjonen har tilsvarende komplementfikserende aktivitet som PMII. Bestemmelse av metanol- og eddiksyreinnhold og IR-spektroskopi viste at fraksjonen inneholder forestrede sukre. Fraksjonen er høymolekylær i området fra ca 300 kDa til  $\geq 475$  kDa. Etter enzymdegradering og påfølgende separasjon på PD-10-kolonne forsvant den komplementfikserende aktiviteten, men metanolyse/GC viste at den nye fraksjonen CgLSur<sub>2</sub>Ilenz hadde et høyt innhold av karbohydrater. Metylering og GC-MS viste at fraksjonen nå inneholdt mye færre forgreningspunkter, samt at rhamnogalakturonan ser ut til å ha forsvunnet. Begge disse strukturene antas å påvirke komplementsystemet.

**CgLSur<sub>2</sub>III** består av 54,8% karbohydrat, og inneholder spesielt mye Gal (26,1%). Fraksjonen er i tillegg rik på Ara (11,95%), Xyl (8,5%) og Gal A (20,8%). 1,3,6 Gal, 1,3 Gal, T Gal, T Ara og 1,3 Ara kan stamme fra arabinogalaktan II. Gal A i form av 1,4 Gal A og 1,3,4 Gal A tyder på innhold av forgrenede homogalakturonankjeder. 1,4 Gal A og 1,3,4 Gal A kan også, sammen med 1,2 Rha, T Rha og T Ara, stamme fra rhamnogalakturonan II. Xyl foreligger mest på formen 1,4 Xyl, og kan sammen med 1,2,4 Xyl, som det muligens finnes spormengder av, stamme fra xylaner. Den komplementfikserende aktiviteten til denne fraksjonen er usikker da det på grunn av en feil som oppstod under testen slik at prøvens

konsentrasjon er ukjent. Testresultatet viste en lav aktivitet, men denne ville sannsynligvis vært høyere med riktig konsentrasjon.

### **Feltarbeid**

Under et opphold i Mali januar og februar 2006 ble det samlet inn materiale av *Combretum glutinosum*, små blader, og utført intervjuer av healere i Kolokani- og Dioilaområdene.

*C. glutinosum*, ”Tiangara” på lokalspråket bambara, er en mye benyttet plante; alle de 45 intervjuede benytter den i sin praksis, og det ble nevnt 27 indikasjoner i Kolokaniområdet og 44 indikasjoner i Dioilaområdet. Blant de hyppigst nevnte indikasjonene er malaria, sår og dysenteri/diarè. En del healere benytter også ”gui” – en parasittvekst som vokser på

*C. glutinosum*. Noen av de intervjuede presiserte i enkelte tilfeller at det skulle brukes små blader. Flere av plantens deler benyttes; blader, stammebark, røtter og rotbark. Det lages oftest dekokt som drikkes eller benyttes til kroppsvask, men det er også vanlig med inhalasjon av damp eller røyk og påsmøring av en blanding av knust plantemateriale og karitèsmør.

### 3. INNLEDNING

#### 3.1 Polysakkarider

Polysakkarider er polymere strukturer bestående av mange monosakkarider bundet sammen med glykosidbindinger. De er store, ofte forgrenede molekyler som har tendens til å være amorf, uten søt smak, og uløselige i vann. Polysakkarider der alle monosakkaridene er av samme type kalles homogene polysakkarider, mens polysakkarider som består av flere typer monosakkarider kalles heterogene polysakkarider (Wikipedia). Polysakkarider kan være lineære eller forgrenede, og struktur og egenskaper bestemmes ut fra sukkersekvensene og glykosidbindingenes konformasjon i polymerene. Polysakkarider er universelle naturlige molekyler som innehar flere vitale funksjoner i levende organismer (Bruneton 1995). I planter har polysakkarider funksjon som

- 1) opplagsnæring: Stivelse (amylose og amylopektin) og glykogen
- 2) struktur: Cellulose, hemicellulose

(Wikipedia).

##### 3.1.1 Strukturelle polysakkarider i planter

###### 3.1.1.1 Plantecelleveggen

Hver plantecelle er omgitt av en rigid cellevegg (Taiz og Zeiger 1991) som er bygd opp av hovedsakelig polysakkarider, men også proteiner og aromatiske substanser (Buchanan et al 2000), og som deles i tre lag; midtlamellen, primær cellevegg og sekundær cellevegg. Midtlamellen er det ytterste laget, og utgjør kontaktflaten mellom cellene (Taiz og Zeiger 1991). Den primære celleveggen, som ligger i midten, er relativt uspesifikk og tilsvarende i alle celletyper. (Taiz og Zeiger 1998). Den dannes ved celledeling (Bidwell 1974), og inneholder opp til 90% (av tørrvekt) polysakkarider, hovedsakelig cellulose, hemicellulose og pektiner (Rose 2003). Etterhvert fortykkes og forsterkes celleveggen ved at det dannes cellulosemikrofibriller (Salisbury og Ross 1969). Den sekundære celleveggen som dannes etter at celleveksten har stoppet kan være svært spesialisert i struktur og komposisjon (Taiz og Zeiger 1998), og inneholder store mengder cellulose og lignin. Midtlamellen inneholder pektiner og pektinsyre (Salisbury og Ross 1969).



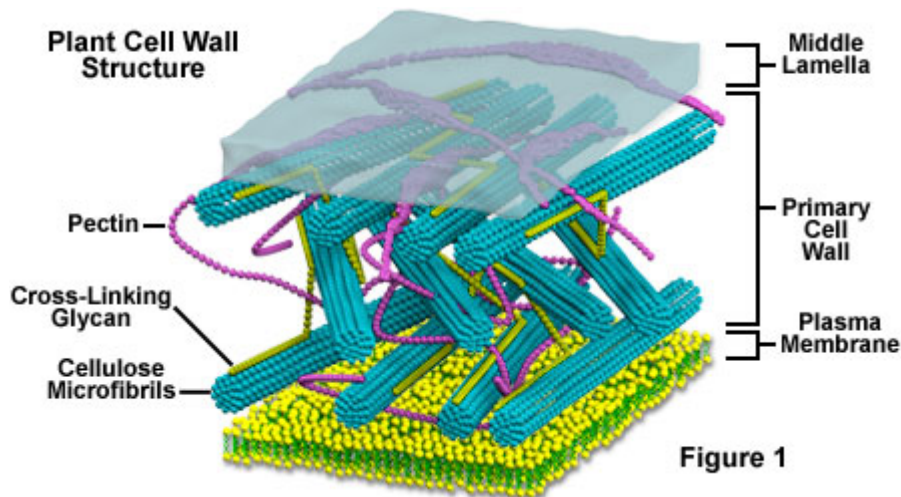


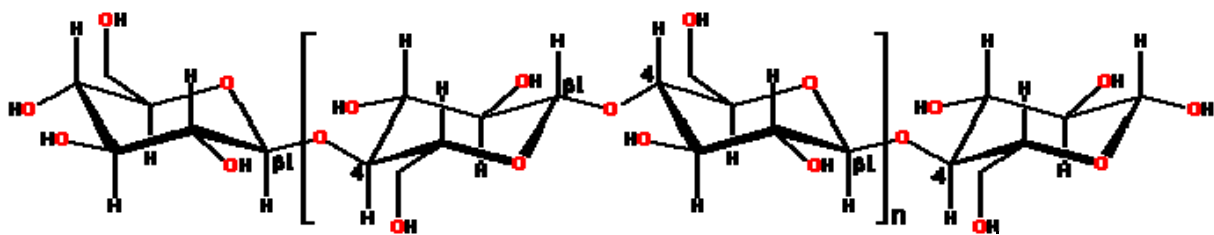
Figure 1

*Figur 3.1.1 Plantecellestruktur (Molecular Expressions)*

### 3.1.1.2 Polysakkrider i plantecelleveggen

#### Cellulose

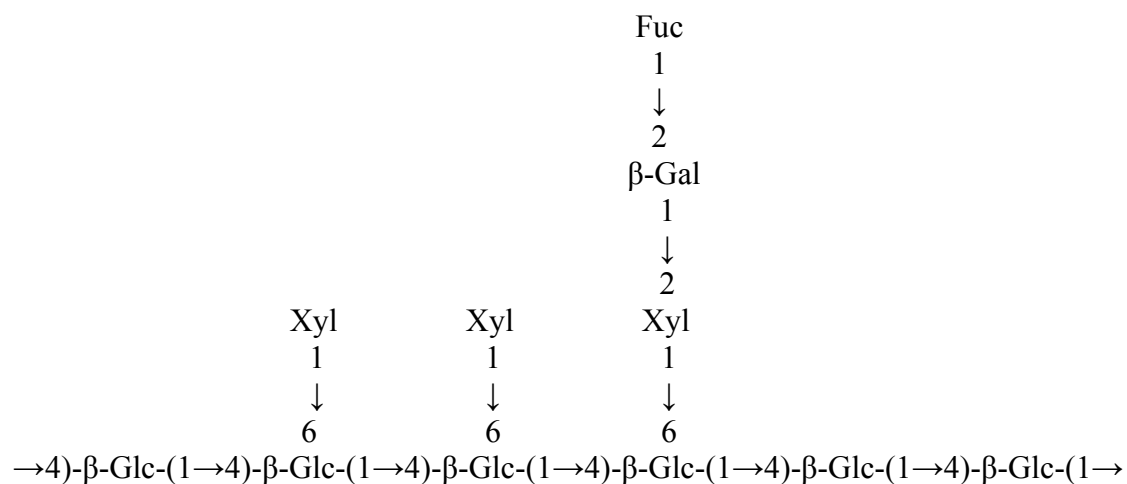
Cellulose er hovedkomponenten i celleveggen hos de fleste planter. Cellulosemolekyler består av lange lineære kjeder av  $\beta$ -1,4-bundne D-glukoseenheter. Kjeden ordner seg parallelt i celleveggen og holder seg tett sammen i miceller ved hjelp av hydrogenbindinger og van der Waals krefter. Micellene danner mikrofibriller som igjen danner makrofibriller (Samuelsson 1999). Cellulose er uløselig i vann (Johnson 1999).

*Figur 3.1.2 Cellulosestruktur (London South Bank University)*

#### Hemicelluloser

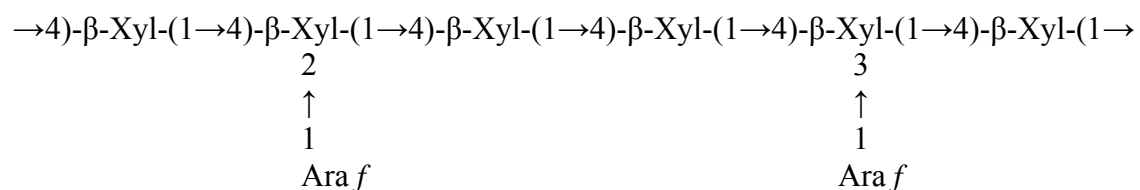
Hemicelluloser er en heterogen gruppe av nøytrale og sure polysakkarider som kan ekstraheres fra primærcelleveggen med varm, alkalisk løsning. Mange hemicellulosepolysakkarider dekker overflaten på cellulosemikrofibrillene, og er orientert parallelt med dem.

*Xyloglukan* er den vanligste hemicellulosen i tofrøede (dicotyledones) planter. Dette molekylet har et skjelett av  $\beta$ -1,4-bundne D-glukoseenheter, likt som cellulose, men til forskjell fra cellulose har xyloglukan korte sidekjeder bestående av kun terminal xylose, eller 1,2-bundet xylose i tillegg til 1,2-bundet galaktose og terminal fucose som hindrer mikrofibrilldannelse. Sidekjedene er bundet i 6-posisjon på glukosemolekylene.



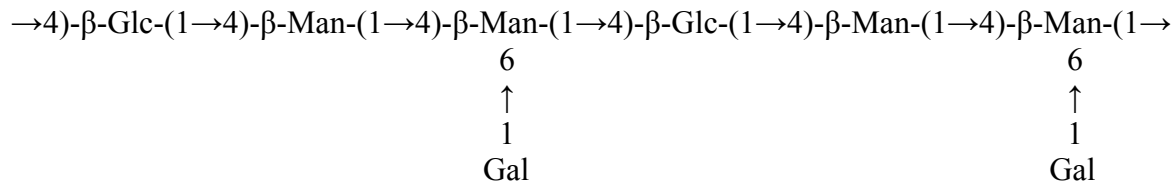
**Figur 3.1.3** Struktur xyloglukan (Taiz og Zeiger 1998)

*Xylaner* er en annen viktig hemicellulose som ofte finnes i større mengder i sekundære cellevegger. De består av 1,4-bundet skjelett av  $\beta$ -D-xylose, og kan ha sidekjeder av arabinose (arabinoxylaner), 4-O-metyl-glukuronsyre (glukuronoxylaner) eller andre sukre .



**Figur 3.1.4** Struktur xylaner (Taiz og Zeiger 1998)

*Glukomanner* er også en viktig hemicellulose i sekundære cellevegger. De har et skjelett som består av alternerende en enhet av  $\beta$ -D-glukose og to enheter av  $\beta$ -D-mannose.

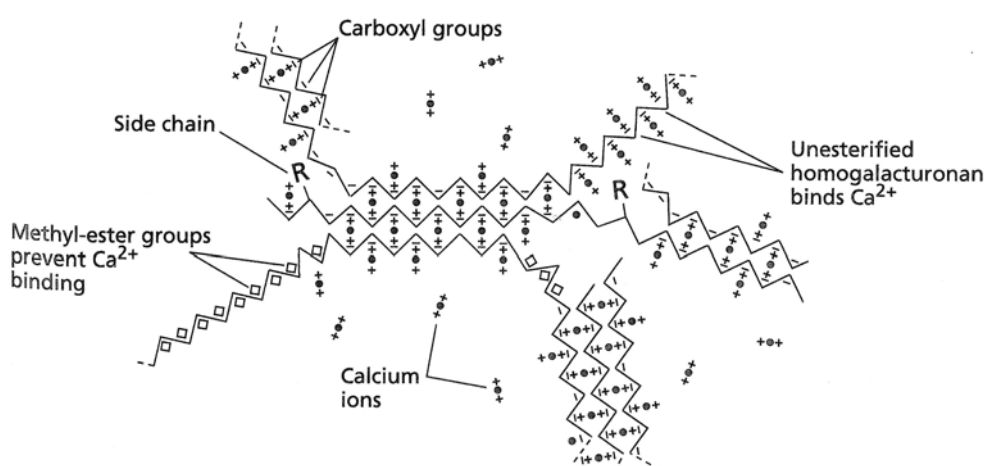


**Figur 3.1.5** Struktur glukomanner (Taiz og Zeiger 1998)

### Pektiner

Pektiner er også en heterogen gruppe polysakkarider, og karakteriseres av innhold av sure sukre i form av galakturonsyre, og nøytrale sukre som rhamnose, galaktose og arabinose. Pektiner er den mest vannløselige komponenten i celleveggen, og kan lett ekstraheres med med varmt vann eller med kalsiumchelatorer.

Ladete hydroksylgrupper ( $\text{COO}^-$ ) på nabomolekyler danner bindinger med  $\text{Ca}^{2+}$ , og danner en gelfase som omslutter cellulose-hemicellulosenettverket, noe som hindrer aggregering og kollaps av cellulosenettverket. I cellene er mange av karboksylsyrene i pektinene esterifisert med metyl, acetyl eller andre grupper slik at det ikke kan dannes  $\text{Ca}^{2+}$ -nettverk, og dermed heller ikke gel (Taiz og Zeiger 2002).



**Figur 3.1.6** Geldannelse av pektin (Taiz og Zeiger 1998)

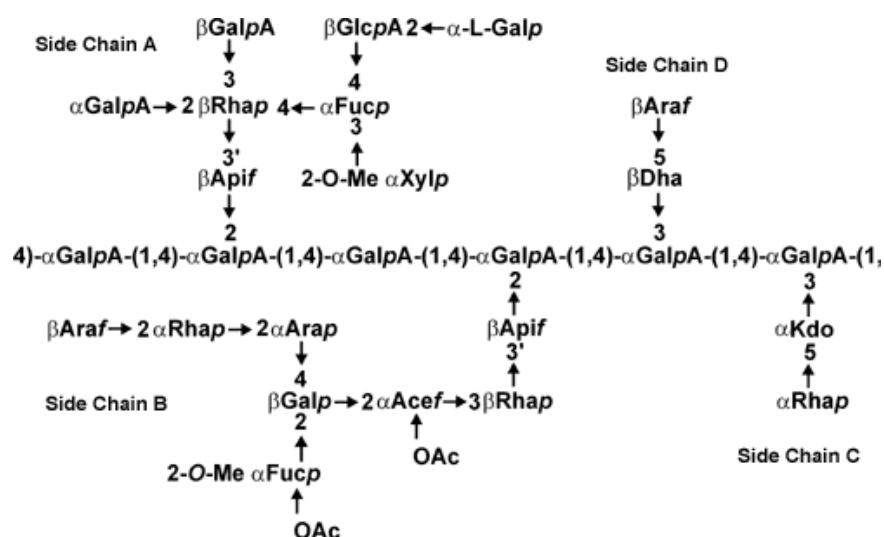
*Homogalakturenan* er et eksempel på et pektin med en relativt enkel struktur. Dette er en lineær polymer av 1→4-bundne α-D-galakuronsyrenheter med innslag av rhamnoseresiduer (Taiz og Zeiger 1998).

→4)-α-Gal A-(1→4)-α-Gal A-(1→4)-α-Gal A-(1→4)-α-Gal A-(1→4)-α-Gal A-(1→

**Figur 3.1.7** *Homogalakturenan* (Taiz og Zeiger 1998)

Det finnes to former for modifisert HGA; xylogalakturenan og rhamnogalakturenan II (Buchanan et al 2000).

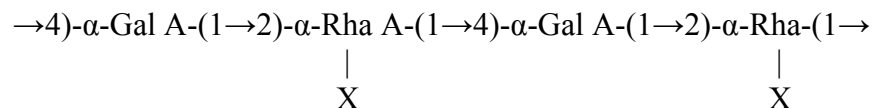
*Rhamnogalakturenan II (RG II)* er et typisk eksempel på et mer komplekst pektin som inneholder minst 10 ulike sukre i et komplisert nettverk. Det er foreslått at denne strukturen kan ha andre funksjoner enn rent strukturelle, som for eksempel deltakelse i celledesignaler (Taiz og Zeiger 1998). Skjelettet inneholder minst 8 1,4-bundne α-D-GalpA-enheter. To strukturelt forskjellige disakkarider (Cog D) er bundet til C-3 på skjelettet, og to strukturelt forskjellige oligosakkarider (A og B) er bundet til C-2 på skjelettet (Complex Carbohydrate Research Center).



**Figur 3.1.8** *Rhamnogalakturenan II* (Complex Carbohydrate Research Center)

*Rhamnogalakturenan I (RG I)* er et av de mest vanlige pektinene, og består av en lang hovedkjede av repeterende disakkarider av 1,2-bundet α-rhamnose og 1,4-bundet α-

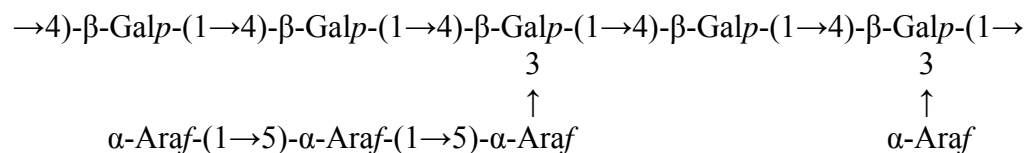
galakturonsyre, samt en rekke sidekjeder av arabinaner, galaktaner, arabinogalaktaner og muligens homogalakuronan. RG I er et stort pektin med "hårete" områder der arabinan- og galaktansidekjeder er festet på hovedkjeden (Teiz og Zeiger 2002).



**Figur 3.1.9** Rhamnogalakturonan I (RG I) (Taiz og Zeiger 1998).

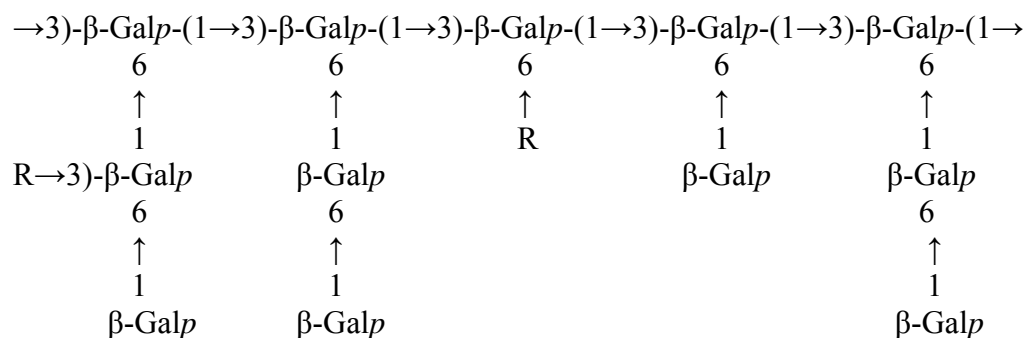
Arabinogalaktaner (AG) blir noen ganger sett på som en egen gruppe polysakkarider, men også som en undergruppe av pektin. Det finnes to typer arabinogalaktaner: AG I og AG II

AG I binder kun til pektiner, og består av 1,4-β-D-galaktankjeder, stort sett med T Ara-enheter ved C-3 posisjon på Gal-enhetene (Buchanan 2000).



**Figur 3.1.10** Arabinogalaktan type I (AG I) (Teiz og Zeiger 1998)

AG II utgjør en stor gruppe med korte 1,3- og 1,6- β-D-galaktankjeder bundet til hverandre ved 1,3,6-bundne forgreningspunktener, og er bundet til spesielle proteiner som kalles arabinogalaktanproteiner (Buchanan 2000).



R = Araf-(1→ eller β-Arap-(1→3)-Araf (1→

**Figur 3.1.11** Arabinogalaktan type II (AG II) (Aspinall 1973)

Arabinogalaktanproteiner (AGPs) består av mer enn 95% karbohydrater, og er derfor mer korrekt proteoglykaner enn glykoproteiner (Buchanan 2000). Sukkerresiduene er

hovedsakelig galaktose og arabinose. AGPs har trolig funksjoner i celledhesjon og celledeling, flere utviklingsprosesser og som polysakkarid-chaperon for nysyntetiserte polysakkarider innil de sekreses til celleveggen (Taiz og Zeiger 2002).

## 3.2 Polysakkarider og immunologisk aktivitet

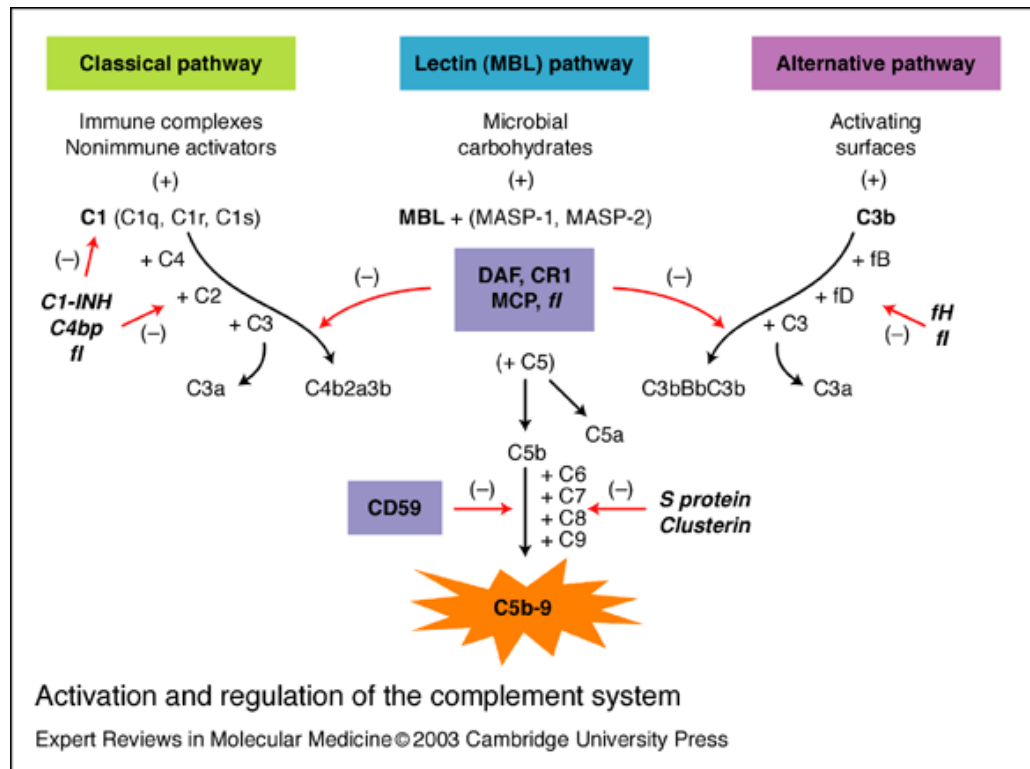
Flere anti-komplementære (komplementaktiverende) polysakkarider er isolert fra bakterier, sopp og planter, deriblant fra varmtvannsekstrakter fra medisinsplanter. Arabinogalaktan, rhamnogalakturonan og arabinan er blant polysakkaridene som har vist å ha komplementfikserende aktivitet (Yamada og Kyiohara 1999).

### 3.2.1 Komplementsystemet

Komplement er betegnelsen på en samling proteinmolekyler som blant annet finnes i blodplasma, og som primært forbindes med det medfødte immunsystemet. Betegnelsen kommer av at man i 1895 fant ut at det finnes et varmfølsomt prinsipp i serum som i tillegg til antistoffer forårsaker bakteriolyse. Komplementsystemet er et såkalt kaskadesystem hvor proteinene som inngår virker både sammen og på hverandre for å utøve biologiske funksjoner.

Hos et friskt individ er komplementkomponentene stor sett inaktive, men de kan aktiveres på tre forskjellige måter:

1. Klassisk aktiveringsvei
2. Alternativ aktiveringsvei
3. Lektinaktiveringsvei



**Figur 3.1.12** Oversikt over komplementsystemet og de tre aktiveringsveiene (Expert reviews).

Som regel er det den alternative eller lektin-aktiveringsveien som opptrer tidligst i immunresponsen da mange bakterier og virus har overflateegenskaper som kan sette i gang disse. Når det gjelder den klassiske aktiveringen kreves det i de fleste tilfeller at det på forhånd er dannet antistoffer mot den aktuelle mikroorganismen, en prosess som tar noe tid.

Komplementsystemet reguleres ved hjelp av mange forskjellige mekanismer og på alle nivåer, hvorav de fleste går ut på å hemme aktiveringsprosessene ved å hindre kompleksdannelse eller å splitte C3/C5-konvertasene.

Aktivering av komplement har, litt forenklet, fire virkninger:

1. Frisetting av lavmolekylære forbindelser som fungerer som anafylatoksiner og aktivatorer av blant annet mastceller og basofile granulocytter slik at disse degranulerer og frigjør en rekke farmakologisk aktive forbindelser. I tillegg har de kjemotaktisk effekt på granulocytter, og leder disse til betennelsesstedet. For kraftig respons kan gi anafylaktisk sjokk.
2. Forsterkning av fagocytose ved binding av komplementprodukter til mikroorganismer.
3. Det terminale komplementkomplekset binder seg til biologiske membraner, som etterhvert lyseres.

4. Ko-stimulering av B-lymfocytene via komplementreseptor 2 når mikroorganismer er bundet til B-lymfocytene slik at det skjer en økning i antistoffproduksjon (Lea 2000).

Det har vist seg at pektiner, inkludert arabinogalaktaner, aktiverer komplementsystemet både via klassisk og alternativ aktiveringsvei. I den alternative aktiveringsveien initieres kaskaden ved at komplementfaktor C3b binder seg til komplementaktiverende polysakkarider.

Resultatet av C3d-polysakkarid-konjugatet som dannes er nedsatt affinitet for faktor H sammenliknet med C3d, noe som nedsetter inaktiveringsraten av C3d-konjugatet. Mulig mekanisme for klassisk aktivering kan være at naturlige humane immunoglobuliner av G- og M-klasse gjenkjenner komplementaktiverende pektinpolysakkarider, noe som er vist med medisinsplanter. Aktivering via klassisk vei betinger tilstedeværelse av  $\text{Ca}^{2+}$  (Yamada og Kiyohara 1999).

### 3.2.2 Struktur og aktivitet hos pektiner

Farmakologisk aktive pektiner har vist å inneholde et "hårete" rhamnogalakturonanliknende område med sjeldne komponentsukre som 3-deoksy-D-manno-2-okulosonsyre (KDO), 3-deoksy-D-lyxo-2-heptulosarsyre (DHA), 2-metylfucose, 2-metylxylose, apiose og acersyre. Isolerte "hårete" områder aktiverer både klassisk og alternativ aktiveringsvei, mens native pektiner kun aktiverer via den alternative veien. Dette indikerer at galakturonanområdene i pektiner regulerer aktiviteten til de "hårete" områdene gjennom den alternative aktiveringsveien. Nøytrale karbohydratkjeder som inneholder  $\beta$ -1,6-bundet galaktose bundet til rhamnogalakturonankjernen er muligens den minimale essensielle strukturen som kreves for komplementaktivitet hos pektiner. Pektiner med komplementfikserende aktivitet er funnet i blant annet *Panax ginseng* (blad), *Plantago major* (blad) og *Angelica acutiloba* (rot) (Yamada og Kiyohara 1999).

Det første isolerte komplementfikserende arabinogalaktanet kalles AGIIa, og er identifisert som arabino- $\beta$ -3,6-galaktan. Strukturen er foreslått å ha et skjelett hovedsakelig bestående av 6-bundne galaktanenheter med  $\alpha$ -L-arabinofuranosylenheter i 5-posisjon, og galaktopyranosylenheter i 3-posisjon. AGIIa aktiverer komplement via både klassisk og alternativ vei. Det er antydning at selvaggregering av det komplementaktiverende AGIIb er en betydelig faktor for komplementaktiverende aktivitet. Komplementfikserende



arabinogalaktaner er funnet i blant annet *Panax ginseng* (blad), *Plantago major* (blad), *Arnica montana* (cellekultur) og *Angelica acutiloba* (rot) (Yamada og Kiyohara 1999).

To eksempler på rene arabinaner med aktivitet på komplementsystemet er  $\alpha$ -2,5-arabinofuran isolert fra *Ziziphus jujuba* (frukt) og et  $\alpha$ -2,3-arabinofuran- $\alpha$ -1,4-gulakankompleks isolert fra *Bupleurum falcatum* (rot) (Paulsen og Barsett 2005).

### Nyere artikler

Det er i de senere år publisert en rekke artikler om studier gjort på plantepolysakkarider og biologisk aktivitet. Her følger et lite utdrag.

Nergard et al undersøkte og sammenliknet én fraksjon fra *Vernonia kotschyana* (Vk2a) og to fraksjoner fra *Coclospermum tinctorium* (Ct50A1 og Ct50A2) med hensyn på komplementfikserende aktivitet og induksjon på proliferasjon av  $\beta$ -celler. De konkluderte med at størrelse på polymerene kan være av betydning for aktivitet da høymolekylære polymere i Ct50A1 og Ct50A2 viste seg å være mer potente enn lavmolekylære. Sidekjeder av arabinogalaktan type II (AG II) så ikke ut til å være av betydning da den mest potente fraksjonen (Vk2a) var den som inneholdt minst AG II. Mengde homogalakturenan er større i Vk2a, men teorien om at dette kunne være årsaken til den høyere aktiviteten svekkes av en tidligere studie som viste at fjerning av homogalakturenan kun medførte en liten nedgang i aktivitet. En annen forskjell som ble funnet var i innhold av glukuronsyre (Glc A); Ct-fraksjonene inneholdt mye mer enn Vk2a, så kanskje kan aktivitetsforskjellene henge sammen med rigiditetsforskjeller i strukturene i og med at homoglukuronaner har en semirigid struktur mens homogalakturenaner har en rigid struktur (Nergard et al 2006).

Westereng et al utførte aktivitesstudier med hensyn på komplementfikserende aktivitet hos hvit kål, og fant ut at fjerning av Araf fra 1,4- $\alpha$ -D-GalpA med små mengder 1,2- $\alpha$ -L-Rhap og sidekjeder av AG II-aktige strukturer ga en reduksjon i aktivitet (Westereng et al 2006).

Capec et al sammenliknet tre ekstrakter fra *Salvia officinalis* L., og fant ut at ekstraktet som inneholdt arabinogalaktan og forgrenet rhamnogalakturenankjerne hadde sterkere immunomodulerende aktivitet enn ekstraktene som inneholdt henholdsvis typisk arabinanrikt pektinmateriale med nøytrale karbohydratkomponenter og glukuronoxylanrelaterte polymere med pektinmateriale (Capec et al 2003).

Fang et al testet biologisk aktivitet hos et bioaktivt polysakkarid identifisert som HAM-3-11b-11 med molekylvekt 105 kDa, og konkluderer med at biologisk aktive polysakkarider er makromolekyler med molekylvekt på tusener til millioner Da. Polysakkaridet inneholder store mengder Gal A, Ara, Rha og Gal, og etter å ha sammenliknet monosakkaridinnhold med funn fra andre planter, tilskrives dets høye biologiske aktivitet den høye graden av lange nøytrale sukkerkjeder (Fang et al 2006).

Inngjerdingen et al har isolert og testet blant annet komplementfikserende aktivitet på to polysakkaridfraksjoner fra *Glinus oppositifolius* (L.). Den ene fraksjonen ble antatt å inneholde et rhamnogalakturonanskjelett med store mengder arabinogalaktan I eller II mens den andre hovedsakelig består av rhamnogalakturonan. Begge viste god aktivitet i komplementfikseringstesten, og induerte kjemotaxe (Inngjerdingen et al 2005).

### **Faktorer som påvirker om aktivering skjer via klassisk eller alternativ vei**

Studier indikerer at acetylgrupper og polyhydroksylgrupper på polysakkaridene er av betydning for komplementaktivering. Acetylgrupper hemmer aktivering via klassisk vei, mens polyhydroksylgrupper fremmer aktivering via alternativ vei. Karboksylreduksjon av uronsyrer i polysakkaridet reduserer signifikant komplementaktivering via klassisk vei, og det er derfor foreslått at karboksylsyrer på uronsyrer er viktig for klassisk aktivering. Hvilken ”polymorfe løselighetsform” (alfa, beta eller gamma) polysakkaridet befinner seg på ser også ut til å være av betydning for aktivitet. Arabinofuranosyl-sidekjeder og metylestre i galakturokjenden ser ut til å hemme henholdsvis klassisk og alternativ vei. Tredimensjonal struktur er foreslått å påvirke aktiviteten av arabinogalaktaner, pektiner og inulin (Yamada og Kiyohara 1999).

## **3.3 Etnofarmakologi**

Etnofarmakologi omfatter tverrfaglige vitenskapelige studier av biologisk aktive forbindelser som tradisjonelt har vært benyttet eller kjent av mennesker til behandling av sykdom. Viktige mål innen etnofarmakologi er dokumentasjon av medisinsk kunnskap i indigene kulturer, vitenskapelige studier av indigene medisiner for på lang sikt å bidra til et bedre helsetilbud for lokalbefolkningen blant annet gjennom utvikling av ”improved drugs”, samt søken etter

farmakologisk unike prinsipper fra eksisterende indigene remedier som kan benyttes til utvikling av nye konvensjonelle legemidler. Studier som i hovedsak fokuserer på det siste kalles bioprospecting (Heinrich 2003). I etnofarmakologiske studier er det viktig med gode samarbeidspartnere fra ulike faglige vitenskapelige hold og fra lokalsamfunnet man søker informasjon, samt å opptre etisk. Dette fordi det øker sjansene for å lykkes, men også for at lokalbefolkningen skal få noe igjen for kunnskapen de deler og ikke føle seg utnyttet (Soejarto 1996, Fenwick 1998).

## 3.4 Tradisjonell medisin i Mali

Mali er en stor innlandsstat i Vest-Afrika. Landet har et areal på 1 240 000 km<sup>2</sup> (Wikipedia), hvorav 65 % er ørken eller semiørken, og et folketall på 11,6 millioner (2003) (Norad). Over 70% av befolkningen driver med jordbruk, og bomull, gull og kjøtt er de viktigste eksportvarene. Dette, sammen med at så stor del av landet er ørken, gjør at landets økonomi påvirkes sterkt av internasjonale prissvingninger og klimatiske endringer, samt at tørkekatastrofer får store konsekvenser (Wikipedia).

Mali er et av verdens fattigste land; i 2003 levde over 70% av befolkningen på under 1 USD om dagen (fattigdomsgrensen). Spedbarnsdødeligheten er nesten 12% (2003), gjennomsnittlig levealder er 45,4 år og gjennomsnittsalderen er på 16,3 år (Wikipedia).

De største helseproblemene i landet er infeksjose sykdommer, parasitter og feilernæring. For å bedre sin helsetilstand benytter befolkningen en blanding av tradisjonell og konvensjonell medisin (Diallo & Paulsen 2000).

Tradisjonell medisin og healere har lang i historie, og er et viktig bidrag også i dagens helsetilbud i Mali. Før kolonitiden var dette det eneste eksisterende helsesystemet, mens healerne under koloniseringen måtte praktisere i hemmelighet. Etter kolonitiden ble tradisjonell medisin igjen godtatt, og i 1968 ble det første instituttet for fytoterapi dannet. I 1973 ble det omgjort til Nasjonalt institutt for forskning på tradisjonell medisin. I dag er navnet endret til Département de Médecines Traditionnelles, DMT, og senteret er en del av Nasjonalt institutt for forskning på folkehelse (INRSP). Depeartementets hovedoppgave er å sikre at tradisjonell medisin er komplementær til konvensjonell medisin, med utgangspunkt i

at medisinene kan lages fra lokale ressurser, spesielt medisinplanter. Arbeidsoppgavene på DMT omfatter bla registrering av tradisjonelle healere og medisinplanter, forskning og utvikling av Improved Traditional Medicines (ITMs). I dag finnes 7 ITMs: *Balembo* mot hoste, *Dysenteral* mot dysenteri, *Gastrosedal* mot magesår og gastritt, *Hepatisane* mot hepatitt, *Laxa-cassia* mot forstoppelse, *Malarial* mot malaria og *Psorospermine* mot dermatitt (Bah 2002). DMT har helt siden oppstart vært interessert i å danne en healerassosiasjon for å oppnå en bedre organisering av healerene og for å samle alle som er interessert i promotering av tradisjonell medisin. Opprettelsen av assosiasjonen har medført en nyttedeling mellom DMT og healerene; strukturelle forbedringer som felles tørkesentre og råmateriallagre, kunnskapsutveksling og samarbeid mellom helsepersonell. Healerene har mulighet for å delta i studier, og de vil da dra nytte av dette i form av reduserte priser og eierskap på resultatene. To har også fått patent på bruk av sine remedier i det konvensjonelle helsesystemet. Samarbeidet med healerene skjer på frivillig basis, og healerene er ikke forpliktet til å dele mer enn de selv føler for om planter de benytter (Diallo & Paulsen 2000).

### 3.5 Combretum glutinosum (Perr ex DC)



*Figur 3.5.1 Combretum glutinosum, store blader (USGS, International program)*



*Figur 3.5.2 Combretum glutinosum, sjeldent stort tre med små blader*

### 3.5.1 Taksonomisk klassifisering

(USDA og Wikipedia)

Rike:	Plantae (planteriket)
Superdivisjon:	Spermatophyta (frøplanter)
Divisjon:	Magnoliophyta (Angiospermae, blomstrende planter, dekkfrøede)
Klasse:	Magnoliopsida (Dicotyledonae, tofrøbladede)
Undeklasse:	Rosidae
Orden:	Myrtales
Familie:	Combretaceae
Slekt:	<i>Combretum</i>
Art:	<i>glutinosum</i>

### 3.5.2 Beskrivelse av planten og dens habitat

*C. glutinosum* finnes som busker og som moderat høye trær (14 m), og vokser i Afrika, fra Senegal til Sudan og Sahelområdet (inkludert Mali), i alle økologiske soner, spesielt i den tørre og sandete jorden på savannene (Neuwinger 1996). Bladene sitter som oftest alternerende, men de kan også sitte kransstilt. De er udelte, filtaktige og noe klebrige. Hver frukt inneholder kun ett frø. Blomstene er luktløse, og består av 4 gulaktige kronblader som er 3-4 cm lange, og som blir brune når frukten er moden (Boullard 2001). De er små og finnes vanligvis på unge skudd, sjeldent sammen med blader (Neuwinger 1996). Det finnes hunn- og hanntrær, samt trær med store og trær med små blader som aldri blir store (5.5 Feltarbeid).

### 3.5.3 Tradisjonell medisinsk bruk av *C. glutinosum*

De fleste av de mange bruksområdene denne drogen har er viteskapelig bekreftet. Den er ”en av de mest forskrevne artene i populærmedisin” i Afrika, og i Sudan, Senegal, Mali med flere benytter man:

- bladene, pga effekter som mageregulerende, rensende (blod, avførende), diuretikum, hypotensiv, hoste/bryst, antimalaria og sårlegende

- bladstilkene som mageregulerende, mot anemi, barnegastritt, ikterus, ødem, malaria og forskjellige øyelidelser (som konjunktivitt).
- fruktene, tørkede og knuste, for å behandle kreft, sår og syfilis

(Boullard 2001).

Planten kalles av noen for ”Mother of Medicines” av den grunn at den brukes mye og til å behandle mange ulike lidelser. Først og fremst er den verdsatt for sine diuretiske og galledrivende effekter. Andre bruksområder er bronkitt, hard hoste, forkjølelse, kolikk (dekokt av 30 g blader drikkes), sårbehandling, gulsott (blader), mageproblemer (bladdekokt), hodepine (blad), afrodisium (unde skudd og røtter), syfilis (frukt), innvollsorm (rotbark), feber, tretthet, forstoppelse og muskelsvakhet (søtet filtrert bladdekokt) kvalme med flere. I Mali brukes plantens blader mot tetanus og dysenteri (Neuwinger 1996).

I Senegal selges planten til bruk ved urinplager, lever- og nyreproblemer, feber og ødem. Noen skiller mellom hann- og hunnplanter, og bruken av disse kan være ulik (Burkill 1985).

Feltarbeid i Mali i forbindelse med tidligere hovedfagsoppgaver ved Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo har gitt informasjon om at planten har en rekke anvendelsesområder. Bladene fra *C. glutinosum* brukes ved behandling av forskjellige typer sår, dysenteri, feber, ikterus, malaria, smerter og tretthet i kroppen (Hansen 2000) og i tillegg elveblindhet, dysmenorè, angst og uro, abdominale smerter, anal og vaginal prolaps, pulmonær/respiratorisk sykdom, hodepine, impotens, anuri, fordøyelsesproblemer, slangebitt, brystsmerter, øyeirritasjon, kvalme og oppkast, diarè og besvimelse. Også andre deler av planten blir brukt; bark, ”gui” (parasittvekst) og rot, med stort sett samme indikasjoner som blad (Ringerud 2003).

#### **3.5.4 Tidligere forskning på *C. glutinosum***

Dekoktekstrakter av blader fra Senegal har vist å ha en kraftig hemmende effekt på hepatitt B virusantigen (HbsAg) *in vitro* og på angiotensin-converting enzyme (ACE). Ut fra disse resultatene er det forståelig at *C. glutinosum* benyttes bla mot hepatitt og hypertensjon i Senegal (Rogers og Verotta 1996).

Fire tanniner er isolert i et metanolekstrakt av *C. glutinosum*-blader; combreglutinin, punicalin, punicalagin og 1,2-(S)-heksahydroksidifenoyl-D-glukose. Disse kan være ansvarlige for ekstraktets hemmende effekt på hepatitt B virus-overflateantigen (Jossang 1994)

*C. glutinosum* har vist antifungal aktivitet mot de patogene soppene *Candida albicans*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* og *Trichophyton rubrum* (Baba-Moussa 1998).

Metanol- og hydrometanolekstrakter har vist å ha en viss antamalaria-aktivitet, og unge blader viser en svært god effekt mot feber, ikterus og leversykdommer (Ouattara et al 2006)

Det er vist at både 50- og 100-graders vannekstrakter av bark og 100-graders vannekstrakt av blad har god komplementfikserende aktivitet (Hansen 2000).

Det er også vist at 50-graders vannekstraktet av blad har god komplementfikserende aktivitet og et høyt karbohydratinnhold, som blant annet består av arabinogalaktan II og rhamanogalaktan I og II, strukturer som er kjent for å ha komplementfikserende aktivitet (Ringerud 2003).

#### **3.5.5 Tidligere forskning på andre arter av *Combretum***

De to største slektene av den afrikanske Combretaceae, *Combretum* og *Terminalia* vokser i de fleste delene av Afrika hvor de på grunn av stort antall ofte dominerer vegetasjonen. De består av slyngplanter, busker og trær, og karakteriseres av frukter med vingeformede vedheng. Tradisjonelle healere i Afrika benytter ulike Combretaceae-arter mot en rekke sykdommer, og det er for det meste arter fra slekten *Combretum* som benyttes. Med få unntak er det kun for *Combretum*-artene det foreligger rapporter om fytokjemi. Slekten *Combretum* utgjør ca 90 arter, men det er bare ca 25 av disse som har vært gjenstand for en form for vitenskaplig forskning. Familien representerer derfor et utforsket reservoar for potensielle nyttige substanser. Bark og blader brukes i stor utstrekning, men frukten benyttes ikke da det er rapportert toksisitet hos mennesker (Rogers og Verotta 1996).



De siste årene er det publisert en rekke artikler om *Combretum*-arter, og videre følger et lite utvalg.

McGaw et al publiserte i 2001 en artikkel om undersøkelse av biologisk aktivitet hos bladedekstrakter fra 20 *Combretum*-arter. Ekstraktene ble screenet for antiinflammatorisk, anthelmintisk, anti-bilharzia (anti-schistosomal) og DNA-skadende aktivitet. Signifikant aktivitet i mer enn ett bioassay ble funnet for *C. apiculatum*, *C. hereroense*, *C. molle* og *C. mossambicense*. Etylacetatekstrakter var generelt mest aktive, etterfulgt av acetonekstrakter og vannekstrakter (McGaw et al 2001).

*C. fragrans*, *C. molle*, *C. psidioides*, *C. zeyheri* og *C. padiodes* har alle vist å ha antimikrobiell aktivitet. *C. fragrans* og *C. padoides* viste de mest lovende antimikrobielle egenskapene ved markant hemming av grampositive bakterier og *Enterobacter aerogenes*. *Combretum*-arter er funnet å inneholde flavonoider, coumariner, antracenglykosider, saponiner, steroider/triterpenoider og tanniner, og artikkelforfatterne mener den viste antimikrobielle aktiviteten i dette forsøket delvis kan skyldes flavonoider (Fyhrquist et al 2001).

Syv Combretacea-arter, deriblant *C. glutinosum*, *C. nigricans*, *C. molle* og *C. hispidum*, ble undersøkt med hensyn på antifungal aktivitet mot de patogene soppene *Candida albicans*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* og *Trichophyton rubrum*. Alle viste antifungal aktivitet, og for noen arter relateres aktiviteten til høyt innhold av saponiner og tanniner (Baba-Moussa 1998).

#### *C. micranthum*

Den første vitenskapelige studien ble utført på den vestafrikanske medisinen ”Kinkeliba” som inneholder *C. micranthum*. Det ble vist at denne arten har mageregulerende, diuretisk og antibakteriell effekt mot både grampositive og gramnegative bakterier (Rogers og Verotta 1996). En annen studie viste at et metanolekstrakt av blader fra *C. micranthum* ikke hadde signifikant antimalariaeffekt (Ancolio et al 2002). I en studie utført på flere medisinsplanter fra Burkina Faso viste polyfenoler fra denne planten å ha høy antioksidanteffekt, mikrobicid aktivitet på *S. dysenteriae*, *S. paratyphi B* og *K. ozenoe*, og mikrobiostatisk aktivitet på *S. flexneri*, *S. boydii*, *S. Typhi*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* og *S. aureus* ATCC 25923 (Karou et al 2005).

#### *C. molle*

Etanol- og vannekstrakter av *C. molle* var med i en studie der det ble testet antimikrobiell aktivitet hos en rekke planter, og kom ut som en av de mest potente hemmerne av vekst hos én eller flere organismer (Geyid et al 2005). En annen studie undersøkte forskjellige ekstrakter av bark med hensyn på anti-HIV-aktivitet, og fant ut at acetonekstraktet viste høyest selektiv hemming av HIV-1-virusreplikasjon (Asres og Bucar 2005).

#### *C. quadrangulare*

Xantinoksidasehemmende aktivitet ble undersøkt hos 288 medisinske planter, og et metanol-vannekstrakt av *C. quadrangulare* kom ut blant de 46 som viste en hemming på over 50% ved en konsentrasjon på 100 µg/ml (Nguyen et al 2004).

#### *C. imberbe*

Fire kjente triterpenoider og ett nytt pentasyklisk triterpenoid fra *C. imberbe*-blader ble testet med hensyn på antibakteriell aktivitet. Resultatene viste aktivitet mot *S. aureus*, *E. coli* og *E. faecalis*, og at det er sannsynlig at disse fem forbindelsene utgjør de viktigste antibakterielle stoffene i bladene (Anghea et al 2006).

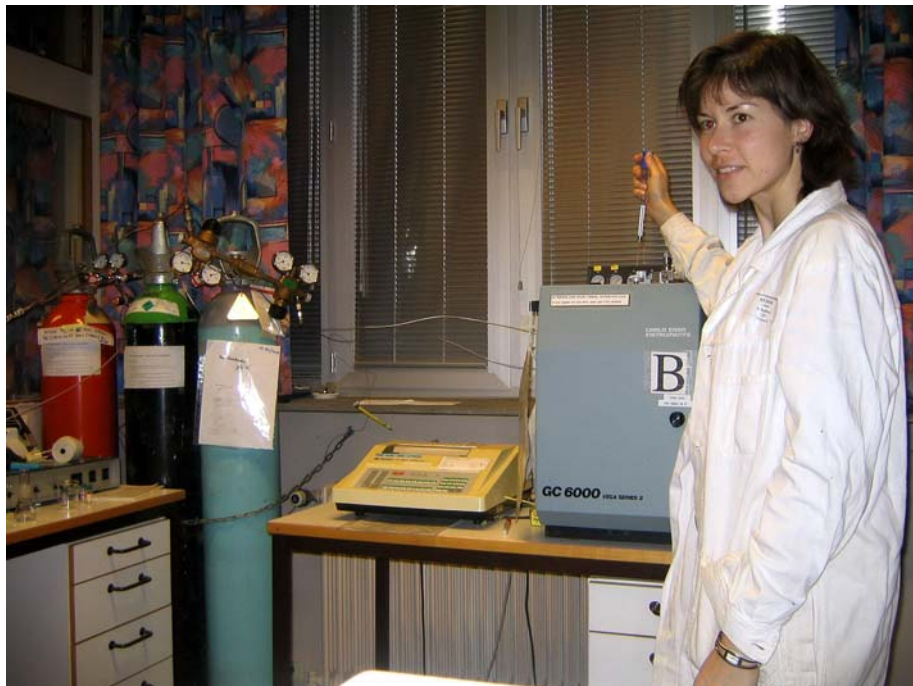
### 3.6 Oppgavens målsetning

Denne hovedfagsoppgaven er en del av et større prosjekt som Avdeling C, Farmasøytisk kjemi på Farmasøytisk institutt, Universitet i Oslo har i fellesskap med Département de Médecines Traditionnelles i Mali med økonomisk støtte fra Nufu. Det overordnede målet for prosjektet er bedre helse for den maliske befolkningen gjennom forskning på tradisjonelle medisinerplanter med sikte på utvikling av "Improved drugs".

Målet med denne oppgaven var tredelt:

1. Struktur- og aktivitetsstudier av polysakkarider fra de store bladene hos *Combretum glutinosum* skulle videreføres fra tidligere studier.
2. Isolering og karakterisering av polysakkarider fra de små bladene hos *Combretum glutinosum* skulle utføres og resultatene skulle sammenliknes med resultater som var oppnådd hos de store bladene.
3. Det skulle gjennomføres feltarbeid i Mali for å intervjuere healere om deres kunnskaper og bruk av planten, om evt om det var forskjellig bruk av store og små blader, innen den tradisjonelle medisinen.

## 4. METODER



## 4.1 GENERELLE METODER

### 4.1.1 Vannkvalitet

Det ble benyttet destillert vann i alle metoder

### 4.1.2 Innveiting

#### I Mali

Overskålsvekt: AND EK-400H

#### I Norge

Overskålsvekt: OHAUS PORTABLE Advanced

Analysevekt: Sartorius BP 221S

### 4.1.3 Filtrering

Gasbind (kokt 10 min i destillert vann på forhånd for å fjerne cellulose)

Membranfiltre: Acro® 50A Device with 5 µm Versapore® membrane (PALL Laboratory)  
 Millex®AA Syringe Driven Filter Unit 0,8 µm, sterile  
 Millex®HA Syringe Driven Filter Unit 0,45 µm, sterile  
 Millex®HA Syringe Driven Filter Unit, 0,45 µm, non-sterile  
 Durapore® Membrane Filters, 0,22 µm GV (vandig) (Millipore)

Filtrering ble utført med nutsj og vakumsugeoppsats ved store væskemengder, og sprøyte og filterenhet ved små væskemengder. Filtrering med gasbind i Mali ble utført uten nutsj og vakumsugeoppsats.

#### 4.1.4 Evakuering av luft

##### Prosedyre

Oppløst luft i løsninger ble evakuert med

- a) vannstrålevakum i 15-30 minutter
- b) gjennombobling med helium 10-20 minutter

#### 4.1.5 Oppkonsentrering

##### Prinsipp

Volumet av løsninger kan reduseres og konsentrasjonen kan økes ved å dampe av en del av løsningsmidlet. På denne måten kan også flyktige stoffer som toluen fjernes fra løsninger.

##### Utstyr

Büchi rotavapor

Rundkolbe (pærekolbe)

##### Prosedyre

Løsningene ble inndampet på rotavapor ved 40-50 °C under vakum.

#### 4.1.6 Vask av dialyseslanger

##### Prinsipp

Dialyseslangene ble vasket før bruk for å fjerne eventuelle rester av cellulose.

##### Reagenser

2% NaOH-løsning (NB! Hansker og briller)

0,05% natriumazidløsning ( $\text{NaN}_3$ )

Destillert vann

### **Utstyr**

Vekt

Kokeplate

Store begerglass

Dialyseslanger: Spectra/Por® 3; MWCO 3500, d: 29 mm

### **Prosedyre**

1. Dialyseslangene ble klippet opp til ønsket lengde (50-60 cm) og skylt godt i springvann.
2. Deretter ble de kokt 10 minutter i 2% NaOH-løsning som var oppvarmet på forhånd.
3. Slangene ble så skylt godt utvendig og innvendig, først med springvann, deretter med destillert vann.
4. Slangene ble kokt på nytt, denne gangen i destillert vann, og deretter skylt i destillert vann.
5. Slangene ble oppbevart i 0,05% natriumazidløsning ved 4 °C for å forhindre bakterievekst.

### **4.1.7 Dialyse**

(Spectrum Laboratories Inc 2005)

#### **Prinsipp**

Dialyse utføres for å fjerne lavmolekylære forbindelser som er uønsket i den videre prosessen fra prøveløsningen. Molekyler med lavere molekylvekt enn cut-off-verdien på porene i dialysemembranen vil diffundere ut i omkringstående væske på grunn av konsentrasjonsforskjeller. Det er derfor viktig å skifte dialysevann flere ganger i løpet av dialyseprosessen.

#### **Reagenser**

Toluen (konservering)

Mettet AgNO<sub>3</sub>-løsning (10%)

### Utstyr

Dialyseslanger: Spectra/Por® 3; MWCO 3500, d: 29 mm

Dialyseklyper

Begerglass (4-5 L)

Trakt

Magnet og magnetrører

Glasstaver

### Prosedyre

1. Dialyseslangene ble skylt med destillert vann inni og utenpå, og deretter lagt i destillert vann i 30 min for å fjerne rester av natriumazidløsning.
2. Dialyseslangene ble lukket med klype og/eller knute i den ene enden.
3. Litt destillert vann ble fylt i slangene for å sjekke om de var tette. Slangene ble hele tiden holdt i kontakt med væske siden de lett ødelegges av tørrhet.
4. Slangene ble fylt 1/2 - 2/3 fulle med prøveløsning.
5. Noen dråper toluen (ca 5) ble tilsatt som konserveringsmiddel.
6. Luft ble presset ut, og slangene ble tettet med klemme og/eller knute på toppen.
7. Slangene ble lagt i en bøtte og satt under rennende springvann og dialysert noen timer eller over natten. (Dette trinnet ble sløffet dersom saltkonsentrasjonen var lav.)
8. Slangene ble deretter overført til store begerglass med destillert vann og dialysert på magnetrører i 3 døgn. 3 glassstaver ble plassert i hvert begerglass for å holde slangene unna magneten. Vann ble skiftet flere ganger under dialysen.
9. Dialysen ble avsluttet når 2 ml av dialysevannet ikke lenger ble blakket av en dråpe mettet  $\text{AgNO}_3$ -løsning.

#### 4.1.8 Frysetørrking

##### Prinsipp

Vann fjernes fra en prøve ved sublimasjon når prøven kjøles ned og settes under vakum.



### **Utstyr**

Metanolbad: Hetofrig (Heto Birkerød, Danmark)

Fryseskap

Frysetørker: Christ® Alpha 1-6

Christ® Alpha 1-4

Pærekolber, 100 ml

Metanolyserør

Supelcorør

### **Prosedyre**

1. Før frysetørring ble løsningene evt dampet inn til ønsket volum (metode 4.1.5).
2. Store volum ble frosset ned i pærekolber under rotasjon i metanolbad ved -40 °C. Små volum ble frosset i enten metanolyserør eller supelcorør i fryseskap
3. Prøven ble påsatt frysetørkeren utvendig (pærekolbe) eller innvendig (metanolyserør, supelcorør dekket med perforert parafilm) og satt under vakum.
4. Tørketiden var 24-48 timer.

## **4.1.9 Sentrifugering**

### **Prinsipp**

En del løsninger ble sentrifugert for å separere bunnfall og supernatant, eller for å fjerne luftbobler.

### **Utstyr**

MSE bordmodell

Heraeus multifuge 4 KR

Christ 901 (Nasjonalt Folkehelseinstitutt)

CP Centrifuge (Beckman) (Nasjonalt Folkehelseinstitutt)

#### **4.1.10 Blanding av løsninger**

##### **Utstyr**

Whirlmixer (Fisons)

MS2 Minishaker (IKA®)

#### **4.1.11 Syrevask av glassutstyr**

##### **Prinsipp**

Glassutstyr kan være forurensset med polysakkarider, spesielt cellulose fra emballasje, noe som kan påvirke karbohydratanalyser. Utstyret ble derfor vasket i saltsyre (HCl) for å spalte eventuelle polysakkarider. Rester av sukker ble fjernet ved grundig skylling med springvann og destillert vann.

##### **Utstyr**

Briller og hansker

pH-papir

Stort begerglass

Stor målesylinder

##### **Reagenser**

Konsentrert saltsyre (37% HCl)

Springvann

Destillert vann

##### **Prosedyre**

1. Glassutstyret ble plassert i store begerglass eller målesylindre, og dekket med saltsyre.
2. Henstand 30 minutter.
3. Utstyret ble fjernet fra syren, og skylt godt i rennende springvann inntil pH i skyllevannet var nøytral (samme pH som vannet).
4. Utstyret ble skylt i destillert vann.
5. Utstyret ble oppbevart i aluminiumsfolie eller i plastboks.

#### **4.1.12 pH-målinger**

##### **Utstyr**

pH-strips: Neutralit pH 1-14 (MERCK)

pH-meter: Orion pH-meter modell 420A (Metric Analyse AS) med Orion ROSS

Reference Electrode Filling Solution. Det ble kalibrert med buffere på pH 4,01 og 7,00, og pH ble justert til ønsket verdi med konsentrert salsyre og 2M NaOH.

#### **4.1.13 Absorbansmålinger**

##### **Utstyr**

BIO-RAD MODEL 3550 MICROPLATEREADER (Avd C, FI)

Microplate reader Thermo max (Heigar laboratorieutstyr) (Folkehelseinstituttet, komplementfikseringstesten)

## 4.2 ISOLERING AV POLYSAKKARIDER

### 4.2.1 Preparering av pulverisert plantemateriale

De fleste små bladene av *C. glutinosum* ble samlet inn under feltarbeid i Dioila-området, men noe materiale ble kjøpt på medisinsplantemarkedet Medina i Bamako. Materialet ble preparert samlet ved DMT.

#### Utstyr

Tørkerist

Stor morter og pistill

#### Prosedyre

1. Bladene ble lagt til tørking på rist, og lufttørket innendørs i to døgn.
2. De tørkede bladene ble grovknust med fingrene, og deretter lagt over i morter.
3. Ved hjelp av morter og pistill ble bladene finknust.

### 4.2.2 Ekstraksjon med organiske løsemidler

#### Prinsipp

Organisk ekstraksjon ble utført for å fjerne upolare substanser fra plantematerialet. Det er viktig å fjerne disse før vandig ekstraksjon for å unngå interferens i videre analyser.

#### Utstyr

Begerglass, 2 L

Magnetrorer

Magneter, 2 stk

Vekt

Gasbind

Trakt

**Reagenser**

Diklormetan,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$

Metanol,  $\text{CH}_3\text{OH}$

Etanol, 70%,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$

**Prosedyre**

1. 150 g av det pulveriserte prøvematerialet ble veid ut og tilsatt ca 1000 ml diklormetan i et 2-liters begerglass.
2. Blandingen ble satt på magnetrører over natten.
3. Diklormetanelekstraktet ble dekantert fra bladmaterialet gjennom 4-lags gasbind i en trakt.
4. Ca 1000 ml ny diklormetan ble tilsatt bladmaterialet, og blandingen ble satt på røring over natten.
5. Prosedyren ble gjentatt til sammen 3 ganger med diklormetan.
6. Deretter ble samme prosedyre gjentatt 3 ganger med metanol og 3 ganger med etanol, 70%. Samme plantemateriale ble benyttet hele veien.

**4.2.3 Ekstraksjon med vann****Prinsipp**

Polare forbindelser trekkes ut fra plantematerialet når vann benyttes som løsemiddel.

Polysakkarider er eksempler på slike forbindelser, men ikke alle polysakkarider løser seg i vann under samme betingelser. Prosessen er blant annet temperaturavhengig; noen polysakkarider løses ut først ved 100 °C, mens den samme temperaturen kan forårsake dekomponering av andre. Prøvematerialet ble derfor ekstrahert to ganger; ved henholdsvis 50°C og 100 °C, slik at det ble dannet to ulike fraksjoner.

### **Utstyr**

Stort begerglass, 2 L

Termometer

Kokeplate med magnetrører og magnet

Gasbind

Trakt

Varmemantel

### **Prosedyre**

1. Tørket plantemateriale fra metode 4.2.2, ca 75 g, ble overført til et stort begerglass, og tilsatt først 750 g destillert vann, og deretter 750 g til da blandingen var veldig tykk.
2. Plantematerialet ble ekstrahert i 2 timer ved 50°C under omrøring. Åpningen på begerglasset ble dekket med aluminiumsfolie for å redusere fordampning. Temperaturen ble kontrollert ved hjelp av termometer.
3. Blandingen ble filtrert gjennom gasbind.
4. Plantematerialet ble deretter overført til en varmemantel og ekstrahert i 2 timer ved 100 °C under omrøring
5. Filtratene ble dampet inn på rotavapor.

## **4.2.4 Gelfiltrering**

### **Prinsipp**

(Pharmacia LKB Biotechnology 1990)

Gelfiltrering er en kromatografisk metode som separerer molekyler etter størrelse.

Kolonnematerialet (stasjonærfase) består av en porøs, inert og fysisk stabil gelmatriks med en gitt porestørrelse. Porene er fylt av en mobilfase. Molekyler som er for store til å heftes av porene elueres ut først, mens mindre molekyler elueres ut etter synkende størrelse. Jo mindre molekylene er, jo lengre vil de befinne seg inni porene, og jo lengre tid vil de bruke på å passere gjennom kolonnen.

#### 4.2.4.1 Biogel-P6

(Bio-Rad Laboratories 2000)

Bio-Gel P-geler er porøse polyakrylamidgeler dannet ved kopolymerisering av akrylamid og N,N'-metylenbisakrylamid. De er ekstremt hydrofile og så godt som uten ladning. Gelene kan fås med ulike partikkelstørrelser og fraksjoneringsområder. Bio-Gel P-6, Medium består av partikler i størrelsesområdet 90-180  $\mu\text{m}$  og egner seg for separasjon av molekyler i området 1-6 kDa. Anbefalt pH-område er 2-10.

#### Utstyr

Kolonne:	XK50 (Pharmacia Biotech)
Matriks:	Bio-Gel P-6
Kolonnevolum: (h: 54 cm, id: 5 cm)	1060 ml
Partikkelstørrelsefordeling:	90- 180 $\mu\text{m}$
Pumpe:	Pharmacia LKB Pump P-1
Fraksjonssamler:	Frac 920 (Amersham Biosciences)
Oppsamlingsrør:	Sentrifugerør, 15 ml (Heger AS)
Filter:	Acro® 50A Device with 5 $\mu\text{m}$ Versapore® membrane (PALL Laboratory)

#### Prosedyre

##### a) Pakking av kolonne

1. Mengde kolonnemateriale ble beregnet ut fra kolonnens volum til 163 gram.
2. 1550 ml destillert vann ble tilsatt gelmaterialet.
3. Gelen fikk svulle i 4 timer.
4. Blandingen ble rørt opp, og deretter fikk gelmaterialet synke. Usvellet materiale som fløt oppå vannet ble dekantert av.
5. Luft ble fjernet ved hjelp av vannstrålevakum.
6. Kolonnematerialet ble overført til kolonnen ved å helle langs en glasstav for å unngå luftbobler.
7. Kolonnen fikk stå over natten for å pakke seg. Det ble samtidig gjennomkjørt med destillert vann.

**b) Separasjon av prøvemateriale**

1. Vannekstraktet ble sentrifugert, og supernatanten ble filtrert 5µm.
2. 100 ml løsning ble applisert på kolonnen, og det ble eluert med destillert vann med en hastighet på 1 ml/min.
3. Eluatet ble samlet opp i fraksjoner på 10 ml.
4. Fraksjonene ble testet for karbohydratinnhold ved hjelp av fenol-svovelsyretesten (metode 4.3.2), og sammenslåing av fraksjonene ble bestemt på bakgrunn av testresultatet.
5. Prosedyren ble gjentatt til hele prøvevolumet var fraksjonert.

**4.2.4.2 Sephacryl S-400 HR**

(Pharmacia 1990)

Sephacryl HR er en gelmatriks som består av kovalent kryssbundet allyldekstran med N,N-metylen-bisakrylamid. Dette gir en hydrofil og rigid matriks med nøye kontrollert porestørrelse og minimal uspesifikk absorpsjon som tåler høy elueringshastighet. Sephacryl S-400 HR er beregnet for separasjon av dekstraner i området 10-2 000 kDa, og egner seg godt for separasjon av polysakkarider. Matriksen er stabil i de mest vanlige buffere, og kan benyttes ved pH 2-11. Anbefalt mengde applisert prøveløsning er 0,5 – 5% av kolonnevolumet.

**4.2.4.2.1 Metode benyttet på store blader****Utstyr**

Kolonne:	Pharmacia
Matriks:	Sephacryl S-400 HR
Kolonnevolum ( h: 25 cm, d: 5 cm)	ca 500 ml
Pumpe:	Pharmacia LKB Pump P-1
Fraksjonssamler:	Pharmacia LKB Super Frac
Oppsamlingsrør:	Trombotestrør, 7 ml (Heger AS)
Filter:	Acro® 50A Filter Device with 5 µm Versapor ® Membrane (PALL Gelman Laboratory)
Plastsprøyte (BD)	10 ml



**Reagenser**

10 mM NaCl

Destillert vann

**Prosedyre**

1. Matriksen ble ristet opp og satt på sug i ca 2 timer for å få fjernet luft.
2. Kolonnen ble klargjort for pakking, og fylt med matriksen via en glasstav for å hindre at luft ble blandet inn.
3. Kolonnen ble eluert med 10mM NaCl.
4. Prøven ble løst i destillert vann og filtrert gjennom usterilt filter, 5 µm.
5. 5 ml ble satt på kolonnen, det ble eluert med 10 mM NaCl med hastighet 1 ml/min, og samlet opp fraksjoner på ca 5 ml.
6. Fraksjonene ble testet for karbohydratinnhold ved hjelp av fenol-svovelsyretesten (metode 4.3.2), og sammenslåing av fraksjonene ble bestemt på bakgrunn av testresultatet.
7. Prosedyren ble gjentatt til hele prøvevolumet var fraksjonert.

**4.2.4.2.2 Metode benyttet på små blader****Utstyr**

Kolonne: XK 26 (Amersham Bioscience)

Matriks: Sephacryl S-400 HR

Kolonnevolum: (h: 90 cm, i.d: 3 cm)Ca 635 ml

Pumpe: Pharmacia LKB Pump P-1

Fraksjonssamler: Pharmacia LKB Super Frac

Oppsamlingsrør: Trombotestrør, 7 ml (Heger AS)

Filter: Acro® 50A Device wih 5 µm Versapore® Membrane  
(PALL Gelman Laboratory)

Plastsprøyte, BD, 30 ml

Ultralydbad

**Reagenser**

Destillert vann

**Prosedyre**

1. 20 (14) mg prøve ble løst i 60 (28) ml destillert vann ved hjelp av ultralyd, og deretter filtrert gjennom filtre med porestørrelse 5  $\mu\text{m}$  og 0,8  $\mu\text{m}$ .
2. 20 (28) ml prøveløsning ble satt på kolonnen.
3. Det ble eluert med destillert vann med en hastighet på 1 ml/min, og 5 ml-fraksjoner ble samlet opp.
4. Fraksjonene ble testet for karbohydratinnhold med fenol-svovelsyretesten (metode 4.3.2), og eventuell sammenslåing av fraksjoner ble bestemt.

**4.2.4.3 PD-10**

PD-10-kolonnen består av Sephadex™ G-25 Medium, og kommer ferdigpakket fra produsent. Den består av partikler i størrelsesområdet 85-260  $\mu\text{m}$ , kan brukes ved pH 2-13, og separerer molekyler med størrelse 1-5 kDa.

**Utstyr**

Kolonne: PD-10 Desalting kolonne, prepakket (Amersham Pharmacia Biotech)  
 Kolonnevolum: Ca 8,3 ml  
 Oppsamlingsrør: Trombotestrør, 7 ml (Heger AS)  
 Skilletrakt  
 10 ml plastsprøyte, BD

**Reagenser**

Destillert vann

Natriumazidløsning, ( $\text{NaN}_3$ ), 0,05%

**Prosedyre**

1. Ca 2 kolonnevolum destillert vann ble dryppet gjennom kolonnen fra en skilletrakt.
2. Prøven, ca 1,5 ml, ble applisert på kolonnen med plastsprøyte.
3. Det ble eluert med destillert vann, og samlet opp fraksjoner à 0,5 ml.
4. Fraksjonene ble testet for karbohydratinnhold med fenol-svovelsyretesten (metode 4.3.2), og eventuell sammenslåing av fraksjoner ble bestemt.
5. Kolonnen ble konserverert med 0,05% natriumazid etter endt bruk.

## 4.2.5 Ionebytterkromaografi

### Prinsipp

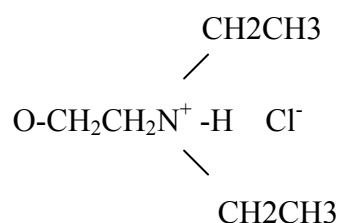
(Pharmacia Fine Chemicals 1983)

En ionebytter består av en uløselig matriks med kovalent bundne ladede grupper. De ladede gruppene er assosiert med mobile motioner som kan byttes ut reversibelt med andre ioner med samme ladning uten at matriksen endres. Separasjon ved ionebytterkromatografi skjer ved reversibel adsorpsjon, og baserer seg på at ulike substanser har ulik affinitet for ionebytteren på grunn av ladningsforskjeller. Ved å endre egenskapene til elueringsmidlet vil ulike substanser elueres ut. Karbohydrater inneholder ofte ladede grupper, noe som gjør dem egnet for separasjon etter ionebytterprinsippet ved at de vil retarderes på kolonnen mens uinteressante molekyler elueres ut.

### 4.2.5.1 DEAE Sepharose Fast Flow

(Pharmacia Fine Chemicals 1983)

Kolonnematerialet består i dette tilfellet av sterkt kryssbundet agarose ( 45-165 µm store agarosekuler) påbunnet funksjonelle dietylamoetylgrupper. DEAE har positiv ladning og klorid bundet til seg som motion.



**Figur 4.2.1** DEAE og kloridmotionet.

Kolonnen er derfor en anionbytter, og ved applisering av prøvemateriale vil negativt ladede grupper på polysakkaridene ta kloridionets plass og retarderes på kolonnen under eluering med destillert vann. Ved å eluere med en gradientløsning av NaCl vil de retarderte stoffene elueres ut etter økende surhetsgrad etterhvert som konsentrasjonen av NaCl blir større.

Nøytrale polysakkarider vil elueres ut med vannet uten å retarderes.

Anbefalt pH-område er 3-9, noe som gjør at de fleste vanlige eluenter kan benyttes.

**Reagenser**

Destillert vann

2 M NaCl

**Utstyr**

Kolonne: Pharmacia  
 Kolonnematriks: DEAE Sepharose Fast Flow  
 Kolonnevolum: Ca 250 ml  
 Pumpe: Perimax Spetec (Holger teknologi)  
 Fraksjonssamler: Frac 920 (Amersham Biosciences)  
 Oppsamlingsrør: Sentrifugerør, 15 ml (Heger AS)

**Prosedyre**

1. Ca 300 ml prøve ble satt på kolonnen med en flowhastighet på 1 ml/min
2. De nøytrale molekyler ble eluert ut med 2 kolonnevolum destillert vann og samlet opp i en stor erlenmeyerkolbe. Flowhastigheten var her 2 ml/min.
3. Fraksjonen ble dampet inn, dialysert og frysetørret.
4. Deretter ble de sure polysakkaridene eluert ut med NaCl-gradient (0-1,5 M) i 12 timer.  
 Flowhastigheten fra saltløsningen til blandekar: 1 ml/min  
 Flowhastigheten fra blandekar til kolonne: 2 ml/min
5. Fraksjonene ble samlet opp i reagensrør på fraksjonssamler.
6. Saltgradienten ble beregnet etter følgende formel:  $C/T = (C_0 \times R)/V_0$
7. Fenol-svovelsyretesten metode (4.3.2) ble utført for å måle karbohydratinnhold, og fraksjonene ble slått sammen på grunnlag av dette testresultatet.
8. Fraksjonene ble deretter dampet inn, dialysert og frysetørret.
9. Til slutt ble det eluert med 2 M NaCl i ca 2 timer. Fraksjonen ble enten dampet inn, dialysert og frysetørret, eller kastet.
10. Prosedyren ble gjentatt til hele prøvevolumet var fraksjonert.

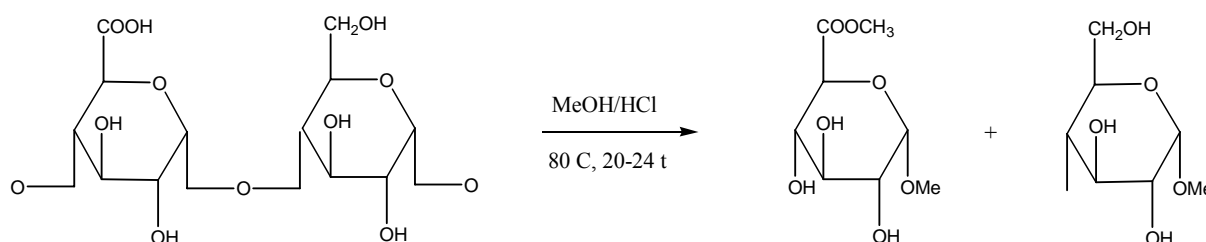
## 4.3 KVANTITATIVE OG KVALITATIVE TESTER PÅ KARBOHYDRATTINNHold

### 4.3.1 Monosakkaridbestemmelse

#### 4.3.1.1 Metanolyse

##### Prinsipp

I et surt, vannfritt, metanolholdig miljø vil glykosidbindingene mellom monomerene i polysakkarider brytes ved metanolyse, og polysakkaridene spaltes i sine enkelte monosakkarider. Det vil dannes et metylglykosid av OH-gruppen ved C1, og en metylester fra COOH-gruppen i C6-posisjon på uronsyrene ved forestring. Det er svært viktig at denne reaksjonen foregår i vannfritt miljø for å unngå hydrolyse av metylglykosidene.



**Figur 4.3.1** Metanolyse av en glykosidbinding mellom et surt og et nøytralt monosakkarid i en polysakkaridkjede (figur fra Hansen 2000).

##### Utstyr

Supelcorør (syrevaskede, metode 4.1.11), 4ml med teflonbelagt skrukork

Parafilm

P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-evakuert eksikator

Automatpipetter, 100 µl og 1 ml

Varmeovn

Oppsett for tørking med N<sub>2</sub>-gass

**Reagenser**

4 M HCl i metanol

Manniol (1,0 µg/µl) i 1M HCl i metanol (intern standard)

Vannfri metanol

**Prosedyre**

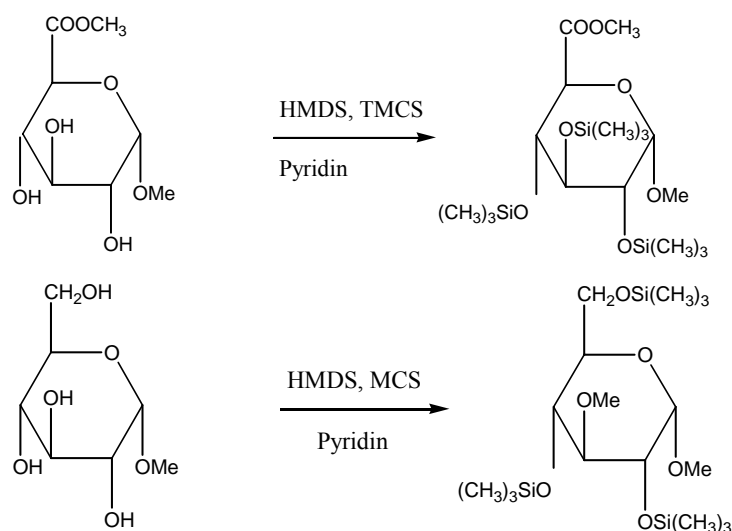
1. 0,5-1 mg prøvemateriale ble veid inn i et syrevasket supelcorør.
2. Supelcorøret ble dekket med perforert parafilm, og prøvematerialet ble tørket under vakum i P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-eksikator ved romtemperatur i minimum 24 timer.
3. 1 ml 4M HCl i metanol og 50-100 µl mannitollosning (ca 10% av innveid prøvemateriale) ble tilsatt prøven.
4. Korken ble skrudd til, og supelcorøret ble satt i varmeskap ved 80 °C i 20-24 timer. Etter 15 minutter ble korken skrudd ytterligere til for å unngå fordampning av metanol.
5. Prøven ble tørket under N<sub>2</sub>-gass ved ca 40 °C til tørrhet.
6. 200 µl vannfri metanol ble tilsatt, og prøven ble igjen tørket under N<sub>2</sub>-gass til tørrhet.
7. Trinn 7 ble gjentatt 2 ganger.
8. Prøven ble tørket i evakuert P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-eksikator i minst 1 time før TMS-derivatisering (metode 4.3.1.2)

**4.3.1.2 TMS-derivatisering**

(Rasmussen 1994)

**Prinsipp**

Monosakkarider er polare og lite flyktige forbindelser, noe som gjør dem lite egnet for gasskromatografisk analyse. Derivatisering der de frie hydroksylgruppene reagerer med trimetylklorosilan og heksametyldisilazan fører til dannelsen av flyktige og termisk stabile pertrimetylsilyleter (TMS-derivater) (figur 4.3.2).



**Figur 4.3.2** Reaksjon mellom metylglykosid med og uten metylestergruppe med TMS-reagens (figur fra Ringerud 2003)

### Utstyr

Automatpipette, 200 µl

Whirlmixer (Fisons)

### Reagenser

TMS-reagens: Trimetyklorsilan (TMCS)	1 ml
Heksametyldisilazan (HMDS)	2 ml
Pyridin (vannfri)	5 ml

### Prosedyre

1. Den metanoliserte prøven fra metode 4.3.1.1 ble tilsatt 200 µl TMS-reagens (eller dobbelt så mye som intern standard), og mikset godt.
2. Prøvene ble hensatt minst 30 minutter (men ikke over natten) i romtemperatur før gasskromatografisk analyse (metode 4.3.1.3).

### 4.3.1.3 Gasskromatografi

(Rasmussen 1998)

#### Prinsipp

Gasskromatografi (GC) er en kolonnekromatografisk metode der stoffene separeres etter deres flyktighet og løselighet i eller affinitet for stasjonærfasen, samt temperatur. Stoffene som skal analyseres må være flyktige og stabile ved de temperaturene som benyttes. Prøven fordampes i injektoren og bringes til kolonnen med bæregassen. Denne gassen må være inert overfor både prøven og stasjonærfasen. Retensjonstiden styres av kolonnetemperaturen, og vil halveres for hver 30-graders temperaturøkning. For analyse av blandinger med stor variasjon i kokepunkt er det en fordel å bruke temperaturprogrammering hvor temperaturen gradvis økes slik at stoffer med lavt kokepunkt elueres ut før stoffer med høyere kokepunkt, og for å få smale topper også for stoffene med høyest kokepunkt. I analytisk GC bør temperaturen være så høy at analysene kan utføres på kortest mulig tid uten at separasjonen av stoffene blir dårlig. Stasjonærfasen kan være et adsorpsjonsmiddel (GSC) eller en ikke-flyktig væske (GLC). Stoffe som skal kunne brukes som stasjonærfase må gi ønsket separasjon, være termisk stabile og ikke reagere irreversibelt med prøven. Silikoner utgjør den viktigste typen stasjonærfase, og ved å variere substituentene kan man få ulik grad av polaritet. Etter separasjon på kolonnen passerer stoffene en detektor hvor det genereres et elektrisk signal. Dette signalet forsterkes og skrives ut som et kromatogram. Detektoren som brukes er en flammionisajonsdetektor (FID), og under forbrenningen dannes det ioner slik at det vil gå en strøm i detektoren som vil være proporsjonal med mengde stoff som forbrennes.

Fordi hvert monosakkarid kan anta forskjellige former, vil det dannes et bestemt mønster av topper som er karakteristisk for hvert sukker. Det vil instille seg en likevekt mellom de ulike formene som kan være  $\alpha$ - eller  $\beta$ -konfigurasjon, åpen eller lukket kjedeform, furanose- eller pyranoseform. Dette karakteristiske mønsteret benyttes sammen med retensjonstider for identifikasjon.

Analysen utføres med intern standard for å korrigere for variasjoner under prøveopparbeidelse, i injisert mengde, samt i det kromatografiske systemet under analysen. Mengden av de ulike monosakkaridene bestemmes kvantitativt ut fra en forhåndslagt standardkurve for en blanding av alle monosakkaridene, sukrenes topparealer og arealet til den interne standarden.



**Utstyr**

Gasskromatograf:	Carlo Erba 6000 vega Series 2
	Programmeringsenhet: ICU 600
Integrator:	Shimadzu C-R6A
Detektor:	Flammeionisasjonsdetektor (FID) med H <sub>2</sub> og O <sub>2</sub> til flammen
Injektor:	Splitt: splitless
Kolonne:	DB-5 (J&W Scientific) "Fused silica" kapillærkolonne
	Lengde: 25 m
	Indre diameter: 0,32 mm
	Filmtykkelse: 0,25 µm
Bæregass:	Helium

**Beingelser for GC-systemet**

Flow:	Gjennom kolonne: 1,8 ml/min (37,6 cm/sek)
	Splittflow: $\approx$ 11 ml/min
	Splittforhold = 1:6
Injiseringvolum:	0,5-1,0 µl
Injektortemperatur:	260°C
Detektortemperatur:	310°C
	1°C/min                      6°C/min                      30°C/min
Temperaturprogram:	140°C -----> 170°C -----> 250°C -----> 300°C

**Prosedyre**

1. Det ble åpnet for gasstrømmene, og GC og integrator ble programmert.
2. Sprøyten ble skylt med pyridin.
3. 0,5-1,0 µl av den TMS-derivatiserte prøven (metode 4.3.1.2) ble injisert.
4. Sprøyten ble skylt med pyridin mellom hver prøveinjeksjon, samt etter siste injeksjon.
5. Innstillingene på integratoren ble justert for å passe kromatogrammet.
6. Gassen til FID ble skrudd av etter kjøring. Hele programmet tok ca 50 min.

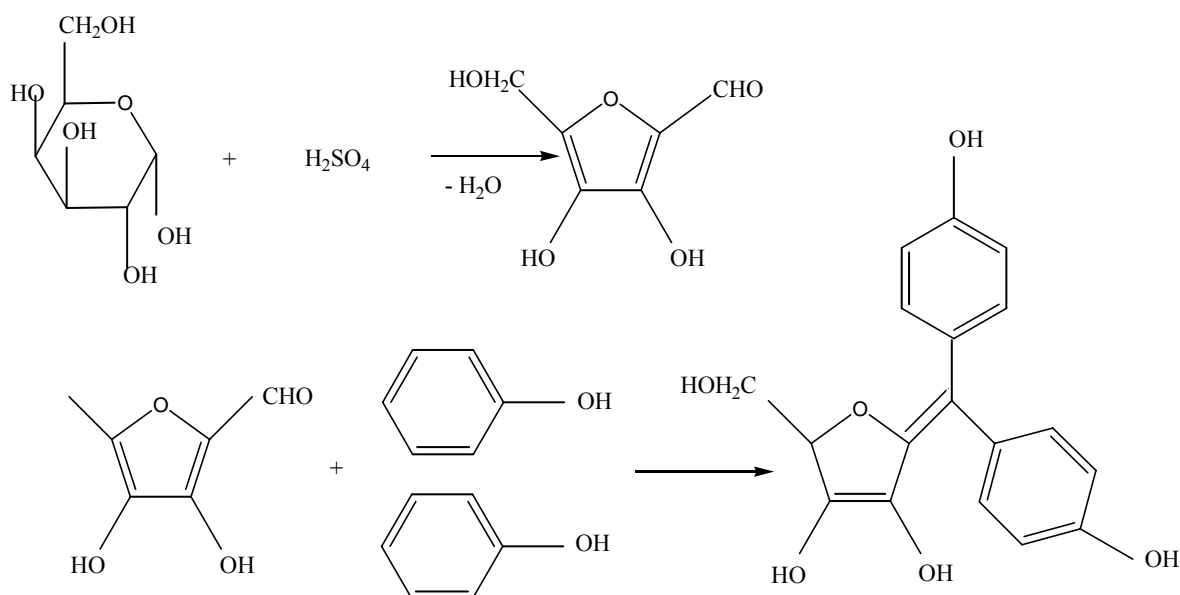
### 4.3.2 Fenol-svovelsyretesten

(Dubois et al 1956, Sturgeon 1990)

#### Prinsipp

Fenol-svovelsyretesten benyttes for å bestemme karbohydratinnhold i en løsning. Prinsippet for denne testen er at monosakkarider, oligosakkarider og polysakkarider spaltes på grunn av varmeutveksling, og omdannes til furfuraldehyder. Sammen med fenol danner disse et kompleks som farger løsningen gul, og gjør at løsningen vil absorbere lys ved 487 nm. Karbohydratinnholdet kan dermed måles spektrofotometrisk. Testen er enkel, reproducerbar og sensitiv, og fargen er stabil. Dette gjør at man kvantitativt kan detektere selv små mengder karbohydrater.

Testen benyttes blant annet for å bestemme hvilke fraksjoner som etter separasjon på gel- og ionebytterkolonne inneholder karbohydrat. Resultatet fra testen viser hvilke fraksjoner som inneholder karbohydrat, ved gulfarging av løsningen, og brukes for å bestemme hvilke fraksjoner som eventuelt kan slås sammen.



**Figur 4.3.3** Reaksjon mellom et monosakkarid og svovelsyre til et anhydrosukker, som deretter kondenserer med to fenolmolekyler til et gulorange kompleks (modifisert figur fra Ringerud 2003)

### **Utstyr**

Finnpipette 40-200  $\mu$ l

Glassrør

Whirlmixer (Fisons)

Mikroplater med flat (rund) bunn

Microplate Reader Model 3550 (BIO-RAD)

Briller, hansker, labfrakk og beskyttelsesforkle

### **Reagenser**

4 % fenol

Konsentrert svovelsyre

### **Prosedyre**

1. 100-200  $\mu$ l prøveløsning fra hver fraksjon ble overført til hvert sitt glassrør og tilsatt 200  $\mu$ l 4 % fenol og 1 ml konsentrert svovelsyre.
2. Blandingen ble mikset kort på whirlmixer
3. Blandingen fikk stå ved romtemperatur i 30 min
4. Blandingene ble mikset kort på whirlmixer, og 100  $\mu$ l fra hvert rør ble overført til brønner på en mikroplate.
5. Absorbansen ble målt spektrofotomerisk ved 490 nm, og plottet mot elueringsvolum.

## 4.4 STRUKTUROPPLARING

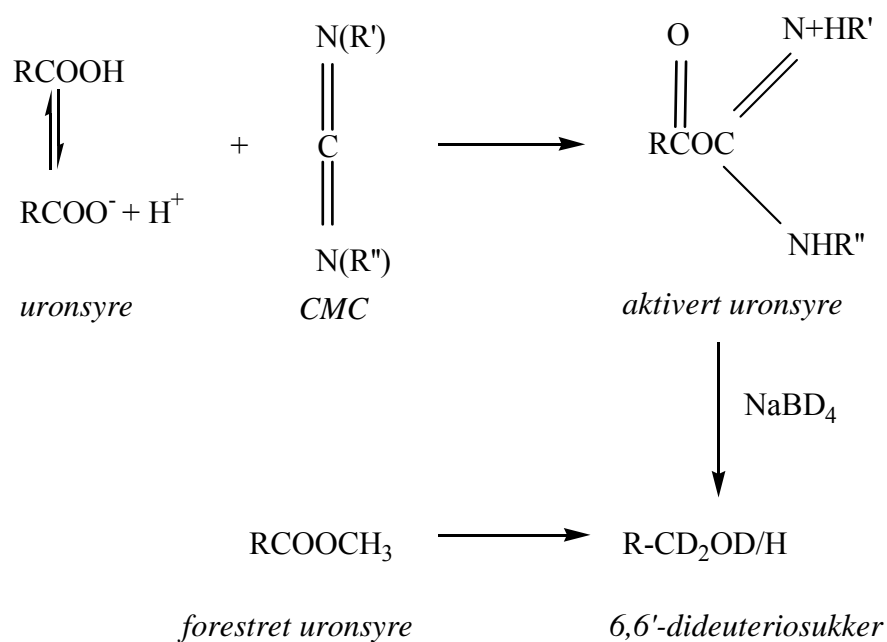
### 4.4.1 Karboksylsyrereduksjon

(Kim og Carpita 1992, Hansen 2000)

#### Prinsipp

Karboksylsyregruppen i uronsyrer reduseres av NaBD<sub>4</sub> slik at de senere kan metyleres.

Esterifiserte uronsyrer kan reduseres direkte til primære alkoholer, mens frie uronsyrer først må aktiveres av carbodiimid. Produktene som dannes er 6,6-dideuteriosukre. Disse kan skilles fra nøytrale sukre ved GC-MS fordi de vil ha fragmenter med molekylvekt M+2 (Figur 4.4.1). GC-MS gir det totale antall uronsyrer, dvs både esterbundne og frie.



**Figur 4.4.1** Aktivering og reduksjon av karboksylsyregruppe i uronsyre, og reduksjon av forestret uronsyre.

#### Utstyr

12,5 cm lange metyleringsrør med skrukork, syrevaskede

Is

pH-papir

Dialyseslanger: Spectra/Por®3; MWCO 3.500, d: 29 mm

SMI® Capillaries-J (gule, syrevaskede)

SMI-J Digital Adjust Micro/Pettor® 50-250µl (Dade International Inc.)

MS2 Minishaker (IKA®)

Frysetørker Alpha 1.6

### Reagenser

Imidazole-HCl

100 mg/ml NaBD<sub>4</sub> i imidazole-HCl (nylaget)

70 mg/ml NaBD<sub>4</sub> i 0,05 M NaOH (nylaget)

Iseddik

0,2 M MES

3,90 g MES ble løst i 50 ml destillert vann.

pH ble justert til 4,75 med 1,5 M NaOH.

Det ble tilsatt destillert vann til totalt 100 ml

2 M TRIZMA

24,22 g TRIZMA ble løst i 50 ml destillert vann

pH ble justert til 9,0 med konsentrert HCl.

Det ble tilsatt destillert vann til totalt 100 ml

500 mg/ml Carbodiimide (nylaget) 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl)-carbodiimide-metho-  
p-toluenesulfonat (CMC)

Oktanoll

### Prosedyre

1. Ca 2 mg frysetørret prøve ble veid inn i 12,5 cm lange metyleringsrør med skrukork, og løst i 5 ml iskald imidazole-HCl
2. Prøvene ble redusert ved porsjonsvis tilsetning av 300 µl + 300 µl + 400 µl (totalt 1 ml) nylaget 100 mg/ml NaBD<sub>4</sub> i imidazole-HCl. Prøvene ble blandet godt etter hver tilsetning, og satt på is i 5 minutter etter de to første tilsetningene, og i 30 minutter etter den siste tilsetningen.
3. Overskudd av reaktant ble ødelagt ved langsom tilsetning av 5 x 100 µl iseddik. Nøytraliseringsreaksjonen ble antatt fullført når løsningen ikke lenger boblet, og pH var under 7.
4. Prøvene ble dialysert i destillert vann i 20-24 timer.
5. Prøvene ble overført til glassrør, og frysetørket i 48 timer.

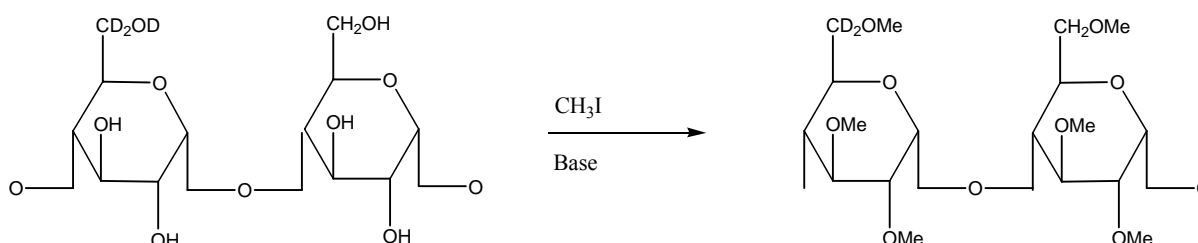
6. De frysetørkede prøvene ble løst i 1 ml destillert vann, og deretter tilsatt 200  $\mu$ l MES og 400  $\mu$ l nylaget 500 mg/ml carbodiimid. Etter blanding ble prøvene inkubert ved 25-30° C i 3 timer.
7. Prøvene ble tilsatt 1 ml 2M TRIZMA og 4 dråper oktanol (antiskummiddel), og ble deretter avkjølt på is.
8. Det ble deretter tilsatt 1 ml nylaget 70 mg/ml NaBD<sub>4</sub> i 0,05 M NaOH.
9. Rørene ble inkubert ved 4 °C over natten.
10. Overskudd av reaktant ble ødelagt ved langsam tilsetning av 5 x 100  $\mu$ l iseddik. Nøytraliseringsreaksjonen ble antatt fullført når løsningen ikke lenger boblet, og pH var under 7.
11. Prøvene ble dialysert 3 timer i rennende springvann, og deretter i destillert vann over natten.
12. Prøvene ble overført til glassrør, og frysetørket i 48 timer.

#### 4.4.2 Metylering

(Ciucanu og Kerek 1984, Hansen 2000)

##### Prinsipp

Karbanion av dimeylsulfoksid (DMSO) danner sammen med OH<sup>-</sup> et sterkt basisk miljø der frie hydroksylgrupper i polysakkaridene ioniseres (deprotonerer) og metyleres i reaksjon med meyljodid.



**Figur 4.4.2** Hydroksylsyregrupper i polysakkaridet metyleres (figur fra Hansen 2000)

##### Utstyr

Vibrax-VXR (IKA Labortechnik)

SMI® Capillaries-J (gule, syrevaskede)

SMI-J Digital Adjust Micro/Pettor® 50-250µl (Dade International Inc.)

Agatmorter

MS2 Minishaker (IKA®)

Oppsett for tørking med N<sub>2</sub>

Vifteovn/varmeskap

Ultralydbad

NB! Bruk kun glassutstyr, syrevasket

### Reagenser

Metanol (vannfri)

Dimetylsulfoksid (DMSO)

NaOH-pellets

Metyljodid

Natriumthiosulfat-pentahydrat

Kloroform

### Prosedyre

1. Frysetørket prøve fra karboksylsyre-reduksjonen (metode 4.4.1) ble løst i 200 µl vannfri metanol og tørket under N<sub>2</sub>-gass for å dehydrere prøven.
2. Prøven ble tilsatt 500 µl DMSO og satt til risting i 20 min ved 200 rpm for å løse glykanene. Da prøven hadde dårlig løselighet i DMSO ble den sonikert på ultralydbad og varmet i varmeskap noen minutter for å øke løseligheten.
3. NaOH-pellets ble revet med DMSO i agatmorter til konsentrasjonen var 120 mg/ml
4. 500 µl av DMSO-/NaOH-suspensjonen ble tilsatt prøven med SMI-pipette (uten å komme i kontakt med glassveggen i røret).
5. Røret ble flushet med nitrogen, og korken skrudd til. Prøven ble deretter satt til risting i 30 min ved 200 rpm.
6. Det ble tilsatt 100 µl metyljodid, og prøven ble ristet i 10 minutter ved 200 rpm.
7. Punkt 6 ble gjentatt.
8. Det ble tilsatt 200 µl metyljodid, og prøven ble ristet i 20 minutter ved 200 rpm.
9. Deretter ble 2 ml kloroform og 10 ml nylaget 100 mg/ml natriumthiosulfat i destillert vann tilsatt. Det ble blandet godt, og sentrifugert for å separere fasene.
10. Den vandige (øverste) fasen ble fjernet.

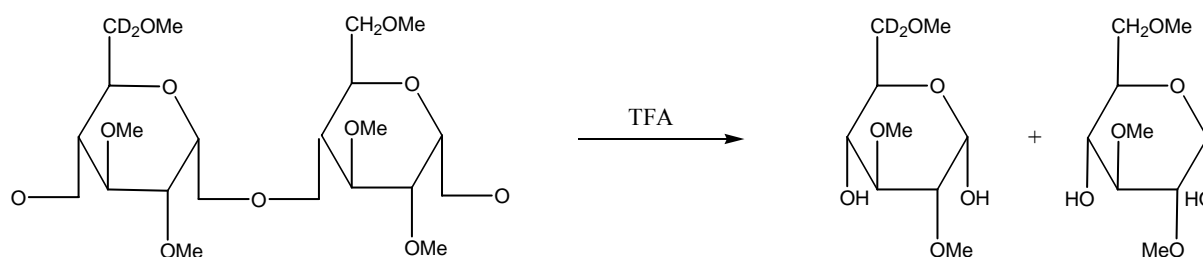
11. Kloroformfasen ble vasket med 4 x 5 ml destillert vann. Det ble ristet og sentrifugert grundig hver gang før vannfasen ble fjernet.
12. Kloroformfasen ble tørket under N<sub>2</sub>-gass.

### 4.4.3 Hydrolyse

(Kim og Carpita 1992, Hansen 2000)

#### Prinsipp

De metylerte polysakkaridene spaltes til monosakkarider ved hydrolyse i surt miljø.



**Figur 4.4.3** Hydrolyse av metylerte polysakkarider med TFA (figur fra Hansen 2000).

#### Utstyr

Oppsett for tørking med N<sub>2</sub>

Vifteovn

#### Reagenser

2,5M trifluoreddiksyre (TFA)

#### Prosedyre

1. Den metylerte prøven (metode 4.4.2) (eller ca 1 mg av ikke-metylert prøve) ble tilsatt 500 µl 2,5M TFA, og gjennomboblet med N<sub>2</sub>-gass.
2. Prøven ble hydrolysert i 2 timer ved 100-102 °C
3. Prøven ble avkjølt, og deretter tørket under N<sub>2</sub>-gass ved 40 °C.

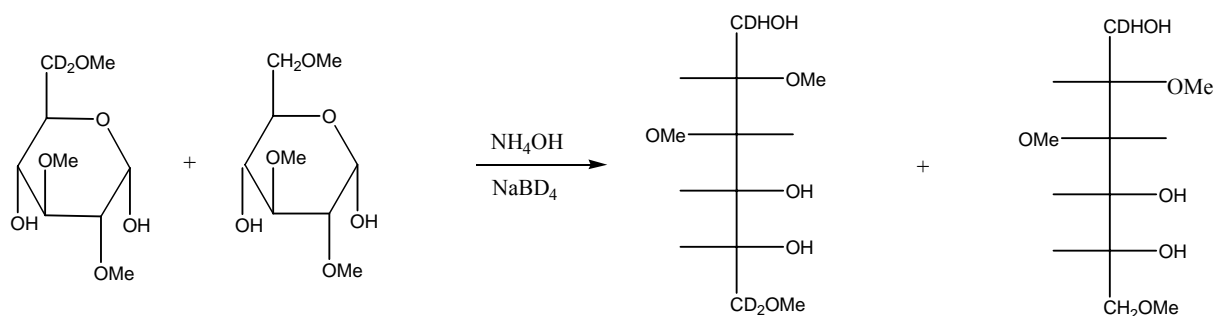


### 4.4.4 Reduksjon

(Kim og Carpita 1992, Hansen 2000)

#### Prinsipp

Ringstrukturen i monosakkaridene brytes ved at syklisk hemiacetal ved C1 reduseres til alditol.



**Figur 4.4.4** Reduksjon av hydroksylgrupper ved C1 (figur fra Hansen 2000)

#### Utstyr

Ultralydbad

Oppsett for tørking med N<sub>2</sub>-gass

Vifteovn

#### Reagenser

2 M NH<sub>3</sub>

1 M NaBD<sub>4</sub> i 2 M NH<sub>3</sub>

Iseddik

5% eddiksyre i metanol

#### Prosedyre

1. Residuet fra hydrolysen (metode 4.4.3) ble løst i 500 µl 2 M NH<sub>3</sub>.
2. Det ble tilsatt 500 µl nylaget 1 M NaBD<sub>4</sub> i 2 M NH<sub>4</sub>OH.
3. Prøven ble sonikert på ultralydbad i 1 minutt, og deretter inkubert ved 60 °C i 1 time
4. Overskudd av reduktant ble ødelagt med 3 x 50 µl iseddik.
5. Prøven ble tørket under N<sub>2</sub>-gass.
6. Det ble tilsatt 2,5 ml eddiksyre i metanol.
7. Prøven ble tørket under N<sub>2</sub>-gass.

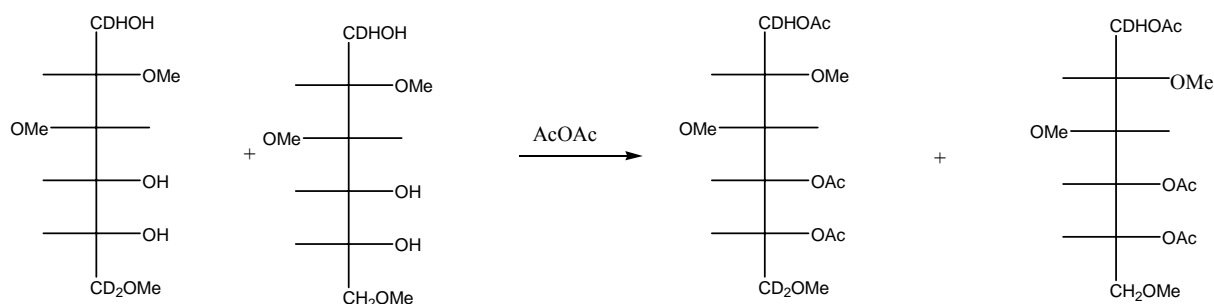
8. Punkt 6 og 7 ble gjentatt.
9. Det ble tilsatt 2,5 ml metanol.
10. Prøven ble tørket under N<sub>2</sub>-gass.
11. Punkt 9 og 10 ble gjentatt. Prøven skulle nå være fri for borsyre.

### 4.4.5 Acetylering

(Kim og Carpita 1992, Hansen 2000)

#### Prinsipp

Hydroksylgruppene som ble dannet ved hydrolyse (metode 4.4.3) og reduksjon (metode 4.4.4) acetyleres med eddiksyreanhydrid for å gjøre dem mer egnet for GC-MS-analyse (metode 4.4.6).



**Figur 4.4.5** Acetylering med eddiksyreanhydrid (figur fra Hansen 2000).

#### Utstyr

Oppsett for tørking med N<sub>2</sub>

Vifteovn

MS2 Minishaker (IKA®)

#### Reagenser

1-metylimidazol

Eddiksyreanhydrid

Diklormetan

Vannfri metanol

**Prosedyre**

1. Den reduserte prøven (metode 4.4.4) ble tilsatt 200 µl 1-metylimidazol og 2 ml eddiksyreanhydrid. Det ble blandet godt, og satt til henstand i 10 minutter.
2. Overskudd av eddiksyreanhydrid ble ødelagt ved tilsats av 10 ml destillert vann. Det ble blandet godt, og satt til henstand i 10 minutter.
3. De delvis metylerte sukrene ble ekstrahert med 2 x 1 ml diklormetan (DCM). For hver ekstraksjon ble prøven blandet 30 sekunder, og diklormetanfasen tatt vare på.
4. Ekstraktene ble samlet og tilbakevasket med 2 x 5 ml vann.
5. Diklormetanfasen ble overført til et Supelcorør og tørket under N<sub>2</sub>-gass.
6. Residuet ble løst i 50 µl vannfri metanol og analysert ved GC-MS.

**4.4.6 GC-MS**

(Lundanes 1994)

**Prinsipp**

Kombinasjon av gasskromatografi (GC) (metode 4.3.1.3) med massespektrometer (MS) som detektor gir strukturinformasjon om analyttene i tillegg til separasjon og kvantifisering. Stoffene elueres på GC-kolonnen, og ledes deretter inn i massespektrometerets ionekilde hvor de vanligvis ioniseres til positive molekyllioner av en elektronsrøm. På grunn av høyt energiinnhold er molekyllionene ofte ustabile, og vil raskt fragmentere.

GC-MS-analysene ble utført av Finn Tønnesen ved Avdeling for Farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk institutt.

**Utstyr og betingelser for GC-MS-systemet**

GC-MS: Fisions GC 8065 (Fisions instruments)

Spekteret ble kjørt ved 70 eV

Detektor: Masseselektiv detektor

GC-kolonne: SPB-1 Fused silica

Injektor: Split-splitless

Filmtykkelse: 0,20 µm

Indre diameter: 0,20 mm

Lengde: 30 m  
Temperaturområde: 80-300 °C  
Injektortemperatur: 250 °C

Viktige primærioner: 45,47, 117, 117, 129, 131, 161, 162, 163, 189, 190, 205, 207, 233, 234, 235, 261, 262 , 307

Temperaturprogram: 80°C  $\xrightarrow[5\text{ min}]{30^\circ\text{C/min}}$  170°C  $\xrightarrow[25\text{ min}]{0,5^\circ\text{C/min}}$  200°C  $\xrightarrow{30^\circ\text{C/min}}$  300°C

#### 4.4.7 Bestemmelse av metanol- og eddiksyreinnhold

(Levigne et al 2002, Liljebäck 2006)

## Prinsipp

Esterifisering av galakturonsyreenheter med metanol- og eddiksyre er en viktig strukturell egenskap hos pektinsubstanser. Dersom nøytrale fraksjoner inneholder mye uronsyrer, kan dette skyldes at syregruppene er esterifisert. I denne metoden bestemmes esterifiseringsgrad ved å bestemme metanol- og eddiksyreinnhold. Grad av metylering korresponderer til prosentdelen av karboksylgrupper esterifisert med metanol. Grad av acetylering er definert som prosentandel av galakturonosylenheter esterifisert med en acetylgruppe, forutsatt at kun hydroksylgrupper er acetyllert.

## Utstyr

Vekt

Supelcorør med spiss bunn, 5 ml

## Magnetrører

Magnet

### Sentrifuge: MSE Bordmodell

10 ml plasticsprøyte, BD

1 ml plasticsprøyte, BD

Maxi-clean IC-H-kolonne (Alltech)

**C18 encapped HPLC-kolonne**

Kolonne:	Superspher 100RP-18, 250 x 4 mm
Pumpe:	Shimadzu, LC-6A
Detektor:	Shimadzu, RID-10A
Integrator/printer:	2220 Recording Integrator, LKG, Bromma

**Reagenser**

10 mM CuSO<sub>4</sub> + 25 mM isopropanol

1 M NaOH

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

**Prosedyre**

1. 5 mg prøve ble veid inn i et Supelcorør med spiss bunn (5 ml) som på forhånd var veid (for å få likevekt i sentrifuge).
2. Det ble tilsatt 0,5 ml av en løsning bestående av 10 mM CuSO<sub>4</sub> og 25 mM isopropanol.
3. Det ble blandet godt, og blandingen ble deretter satt på røring med magnet i 1 time, evt lenger dersom det ikke var dannet en jevn, grov suspensjon.
4. Det ble tilsatt 0,5 ml 1 M NaOH og blandet godt. Blandingen ble satt på magnetrører på kjølerom (4 °C) i 1 time.
5. Prøven ble sentrifuert i 10 minutter på nivå 8, og supernatanten ble deretter sugd opp med plastsprøyte og presset gjennom en Maxi-clean-kolonne, som på forhånd var vasket med 10 ml destillert vann.

**HPLC**

6. Prøven ble deretter injisert på en C18 encapped HPLC-kolonne. Det ble eluert med 4 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> med en flow på 0,7 ml/min.
7. Det ble først kjørt en standardblanding av metanol, eddiksyre og isopropanol.
8. Systemet og sprøyten ble skylt med 4 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> mellom hver injeksjon.

### 4.4.8 IR-spektroskopi

(Pedersen-Bjergaard 1999)

#### Prinsipp

IR er elektromagnetisk stråling i bølgelengdeområdet 800-300 000 nm, og er vesentlig mindre energirik enn UV/VIS-stråling. Dette betyr at IR-stråling ikke har nok energi til å kunne fremkalle elektronisk eksitasjon, men kun skaper vibrasjoner og rotasjoner i molekylene som analyseres. Dette kan detekteres, og gir opphav til spektre med flere og smalere absorpsjonsbånd enn man får ved UV/VIS, og de informasjonsrike IR-spektrene egner seg godt til identifikasjon.

Organiske forbindelser vil absorbere elektromagnetisk stråling avhengig av hvilke funksjonelle grupper og kjemiske bindinger de inneholder. Området for avlesning av funksjonelle grupper strekker seg typisk fra  $1200\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$ , og et absorpsjonsbånd ved  $1740\text{ cm}^{-1}$ , samt ved ca 1300, indikerer at molekylet inneholder esterbindinger. Dersom stoffet inneholder esterbindinger vil disse absorpsjonsbåndene avta ved NaOH-behandling av stoffet.

#### Utstyr

Dialyseslanger: MWCO: 3500, id: 29 mm

Frysetørker

Morter og pistill

Tablettpresse (C-30 presse, RIIC)

Spektrofotometer

#### Reagenser

0,1 M NaOH

Tørket kaliumbromid, KBr

#### Prosedyre

1. 5 mg frysetørket prøve ble løst i 1 ml 0,1 M NaOH.
2. Prøven ble satt på magnetomrøring over natten, og deretter dialysert i destillert vann i 24 timer med hyppig utskiftning av vann. Det ble sjekket at pH var lik som for rent destillert vann.

3. Prøven ble frysetørket.
4. 1 mg frysetørket NaOH-behandlet prøve ble blandet godt med ca 100 mg KBr i en morter. Blandingen ble revet grundig.
5. Pulverblandingen ble deretter presset til transparente tabletter i en høytrykkspresse (10 tonn/cm<sup>3</sup>).
6. Tablettenes IR-spekter ble tatt opp ved måling i IR-spektrofotometeret.
7. Punkt 4-6 ble også gjort med 1 mg ikke-NaOH-behandlet prøve.

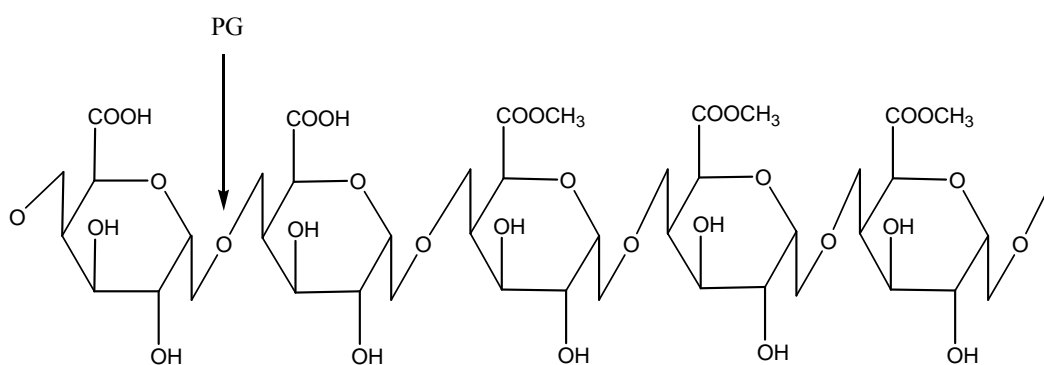
#### 4.4.9 Enzymatisk degradering av pektin

##### Deesterifisering med NaOH og galacturonanasebehandling

(Yu et al. 2001, Samuelsen et al. 1996, Voragen et al. 2000)

##### Prinsipp

Enzymdegradering av pektinholdige fraksjoner ble utført for å isolere de forgrendene ("hairy") områdene fra resten av pektinet. Uronsyrene i polysakkaridene ble først deesterifisert med NaOH. Deretter ble strukturene behandlet med polygalacturonanase, et enzym som hydrolyserer glykosidbindinger i ikke-esterifiserte områder av homogalakuronan (figur 4.4.6).



**Figur 4.4.6** Polygalacturonanase (PG) spalter glykosidbindinger i ikke-esterifiserte områder i homogalakuronankjeden (figur fra Voragen et al. 2000).

Etter degraderingen ble de forgrenede områdene isolert ved separasjon på en PD-10-kolonne (metode 4.2.4.3), og analysert med hensyn på komplementfikserende aktivitet (metode 4.6.1), monosakkaridinnhold (metanolyse, metode 4.3.1.1- 4.3.1.3) og bindingsforhold (metylering, metode 4.4.1 - 4.4.6)

### Utstyr

Liten erlenmeyerkolbe

Magnetrører og magnet

Ultralydbad

pH-papir

Millex®-HA Syringe Driven Filter Unit 0,45 µm

Sentrifuge

Whirlmixer (Fisons)

Varmeskap

### Reagenser

0,1 M NaOH

Eddiksyre p.a.

Toluen

50 mM natruim-acetatbuffer (pH=4,2)

Endo-polygalacturonanase 5000U/ml i 3,2 M ammoniumsulfat

LOT: MPG00301, EXP: 2010 (Megazyme)

### Prosedyre

1. 10 mg frysetørket prøve ble løst i 3 ml 0,1 M NaOH i en liten erlenmeyerkolbe.
2. Prøven ble satt på magnetrører og sonikert kort på ultralydbad for at den skulle løse seg. Det ble evt tilsatt små porsjoner av 0,1 M NaOH til alt var løst.
3. Prøven ble satt til henstand godt tildekket ved romtemperatur i 2 timer.
4. Løsningen ble nøytralisert ved dråpevis tilsetning av eddiksyre. pH ble sjekket ved hjelp av pH-papir.
5. Løsningen ble tilsatt 10 ml natrium-acetatbuffer og noen dråper toluen.
6. 60 µl galakturonidase ble tilsatt, og kolben ble tildekket og satt på magnetrører i varmeskap i 72 timer.
7. Løsningen fikk et oppkok for denaturering av enzym.
8. Etter avkjøling ble løsningene filtrert 0,45 µm, evt først sentrifugert, og deretter dampet inn. Evt bunnfall ble frosset ned. Molekylene i løsningen ble separert på en PD-10-kolonne (metode 4.2.4.3), og karbohydratinnholdet ble bestemt ved hjelp av fenolsvovelsyretesten (metode 4.3.2). Noen av fraksjonene ble slått sammen på bakgrunn av resultatet fra denne testen, og frysetørket.



9. Deretter ble prøven redusert og metylert (metode 4.4.1-4.4.6), testet for komplementfikserende aktivitet (metode 4.6.1), og karbohydratprofilen ble bestemt ved metanalyse og GC (metode 4.3.1.1-4.3.1.3).

## 4.5 MOLEKYLVEKTBESTEMMELSE

### 4.5.1 FPLC med Superose 6

#### Prinsipp

Gelfiltrering er generelt beskrevet under 4.2.4. Superose 6-matriksen består av kryssbundet agarose, og er stabil ved bruk i pH-området 3-12. Den har en gjennomsnittlig partikkeldiameter på 13  $\mu\text{m}$ , og har et optimalt separasjonsområde for globulære proteiner på 5-5 000 kDa. Kolonnen som ble benyttet var en fedigpakket Tricorn high performance 10/300-kolonne fra Amersham Biosciences. Prøveløsningen ble separert på Superose 6-kolonnen for å bestemme omtrentlig molekylvekt på polysakkaridene i prøven. Det ble benyttet dekstraner med kjent molekylvekt for å lage en standardkurve hvor logaritmen til molekylvekten ble plottet mot elueringsvolumet.

#### Utstyr

AKTA-FPLC-system fra Amersham Pharmacia Biotech

Kolonne:	Tricorn Superose 6 10/300 GL, prepaced Ca 24 ml (10 x 300-310 mm)
Pumpe:	P-920
Ventilinjektor:	Valve Inv-907
Monitor:	UPC-900
Fraksjonssamler:	Amersham Pharmacia Biotech Frac-900
Skriver:	hpdeskjet 980 cxi, professional series
Dataprogram:	UNICORN V4.00.16
1 ml Terumo sprøyter	
Trombotestrør, 7 ml (Heger AS)	
Millex®HA Syringe Driven Filer Unit, 0,45 $\mu\text{m}$ , non-sterile	

#### Betingelser for FPLC-systemet

Konsentrasjon, prøver og standarder: 2 mg/ml	
Injisert volum:	500 $\mu\text{l}$
Hastighet:	0,5 ml/min
Fraksjonsstørrelse:	0,5 ml (1 min)
Antall rør:	71

**Reagenser**

Elueringsvæske:	10 mM NaCl, filtrert 0,22 µm og degasset med helium
Vask av kolonnen:	0,1 M NaOH
	50 % eddiksyre

**Standarder**

Det ble brukt 4 dekstraner som standarder. Dekstraner er polysakkarider som er modifisert til ønsket molekylvekt, og på grunn av den kjente molekylvekten ble de brukt for å lage en standardkurve som igjen ble benyttet for å beregne omtrentlig molekylvekt for polymerene i prøveløsningen (tabell 4.5.1).

**Tabell 4.5.1.** Oversikt over benyttede dekstranstandarder.

<b>Dekstran</b>	<b>Molekylvekt, Da</b>	<b>Mn, Da</b>
T500, lot 9307	475 000	153 000
T250, lot 8374	233 000	123 000
B 512 (Dex 40T Fr 7, 8030)	19 000	18 500
B 512 (Fr 11640-II-IX)	5 600	3 170

**Prosedyre**

1. 2 mg av dekstranstandarder og prøve ble løst i 10 mM NaCl.
2. Løsningen ble blandet godt, og filtrert gjennom et sprøytefilter på 0,45 µm
3. Løsningen ble trukket opp i injeksjonssprøyten, og evt luft ble fjernet.
4. Løsningen ble injisert.
5. Injeksjon på kolonnen og start av pumpe ble styrt fra en PC med programmet UNICORN V4.00.16

## 4.6 BIOLOGISK AKTIVITET

### 4.6.1 Komplementfikseringstesten

(Michaelsen et al 2000)

Komplementfikseringstesten ble utført ved Det Nasjonale Folkehelseinstituttet under veiledning av Terje E. Michaelsen.

#### Prinsipp

Komplementsystemet er en viktig del av det medfødte immunsystemet, men er også nært knyttet til det adaptive immunsystemet (Michaelsen et al 2000). Flere polysakkarider har vist seg å påvirke dette systemet ved at de bindes til komplementfaktorer og dermed initierer kaskaden, vanligvis via den klassiske eller den alternative veien (Yamada og Kiyohara 1999).

I denne testen brukes blodceller (erytrocytter) fra sau, antistoff fra kanin og humant komplement. Initielt får erytrocytter og antistoff mulighet til å danne immunkomplekser som kan aktivere komplementkaskaden, mens polysakkaridene får reagere med komplement (Michelsen et al 2000). Endeproduktet i komplementkaskaden, det terminale komplementkompleks (TCC), binder seg til erytrocyttene og induserer lyse av disse. Hvis de aktuelle polysakkaridene har komplementfikserende aktivitet vil dette kunne måles ut fra lyseringsgrad hos blodcellene (Lea 2000), som da vil være redusert. Til dette brukes absorpsjonsmåling med ELISA (Michaelsen et al 2000). Man kan ut fra denne testen ikke si noe om polysakkaridene har virket aktiverende eller hemmende på komplementfaktorene siden begge påvirkninger fører til nedsatt lyse. Komplementaktivering gir reduksjon av lyse på grunn av forbruk av komplement, mens hemming av komplement gir reduksjon av lyse på grunn av interaksjoner med enkelte komplementfaktorer slik at disse hemmes (Yamada og Kiyohara 1999).

#### Utstyr

Sentrifuge Sorvall GLC-1

CP Centrifuge (Beckman)

Varmeskap (37 °C)

Risteplate

Automatpipetter

Mikrotiterplater med 96 brønner, rund og flat bunn.

Microplate reader Thermo max (Heigar laboratorieutstyr)

Dataprogram: Softmax

Whirlmixer (Fisons)

### Reagenser

Saueblod:	Pakkede blodceller fra sau. Hvit 120, 23.02.2006 Hvit 122, 08.08.2006
Antistoff:	9020 Amboceptor chem, fortynnet 1:10 i veronalbuffer
Komplement:	ECG 29.11.05
Veronal/BSA buffer:	250 ml veronalbuffer (CFT pH 7,2) 1,67 ml Bovine Serum Albumin (BSA), 30% 0,5 ml natriumazid, 10% Bufferen vil inneholde 2 mg/ml BSA og 0,002% natriumazid
Standard:	<i>Plantago major</i> L, fraksjon II (PM II), 1 mg/ml (Samuelsen et al 1996) 0,9% NaCl-oppløsning Destillert vann

### Prosedyre

#### A: Vasking av saueblodceller

1. Nødvendig mengde blod (100 ml pr mikrotiterplate) ble utpipetert fra oppslemmet blod og over i reagensrør (ett rør pr plate).
2. Blodet ble vasket 2 ganger med noen ml 0,9% NaCl-løsning, og deretter 1 gang med noen ml veronalbuffer. Mellom hver vask ble det sentrifugert til blodcellene precipiterte, ca 5 minutter, og vaskevannet ble fjernet.

#### B: Sensibilisering av saueblodceller

1. 60 µl av de vaskede blodcellene ble tilsatt 5,925 ml veronal/BSA-buffer og 15 µl Amboceptor (per mikrotitrerplate) i et reagensrør.
2. Reagensrøret ble inkubert på risting i 30 minutter ved 37 °C.
3. Blandingen ble sentrifugert, og supernatanten fjernet.

4. Blandingen ble deretter vasket 2 ganger med 0,9% NaCl-løsning, og 1 gang med veronal/BSA-buffer. Mellom hver vask ble det sentrifugert i ca 5 minutter, og vaskevannet ble fjernet.
5. Til slutt ble blodet fortynnet med 5,940 ml veronal/BSA-buffer til en 1% løsning av blodceller.

*C: Fortynning av prøver og standard*

1. Det ble veid inn 1 mg frysetørket prøve.
2. Prøvene ble løst i 1 ml veronal/BSA-buffer slik at stamløsningen ble 1 mg/ml.
3. Det ble laget en fortynningrekke av standarder og prøver som vist i tabell 4.6.1

**Tabell 4.6.1** Fortynningsrekke for standard og prøver

Rør	Konsentrasjon	Innhold
1	500 µl/ml	300 µl veronal/BSA-buffer + 300 µl stamløsning
2	250 µl/ml	300 µl veronal/BSA-buffer + 300 µl fra rør 1
3	125 µl/ml	300 µl veronal/BSA-buffer + 300 µl fra rør 2
4	62,5 µl/ml	300 µl veronal/BSA-buffer + 300 µl fra rør 3
5	31,3 µl/ml	300 µl veronal/BSA-buffer + 300 µl fra rør 4
6	15,6 µl/ml	300 µl veronal/BSA-buffer + 300 µl fra rør 5

*D: Titreringskurve for komplementkilden*

Dette trinnet ble utført for å bestemme hvilken fortynning av komplement som ga ønsket lyseringsgrad av blodcellene.

1. I en rundbunnet mikrotitrerplate ble 12 brønner tilsatt 100 µl destillert vann, og 32 andre brønner ble tilsatt 50 µl veronal/BSA-buffer.
2. Det ble laget en fortynningsserie av komplement i buffer som vist i tabell 4.6.2.

**Tabell 4.6.2** Fortynning av komplement

Forhold Komplement : buffer	Komplement, Mikroliter	Veronal/BSA-buffer, mikroliter
1:50	10	490
1:60	10	590
1:70	10	690
1:80	10	790
1:90	10	890
1:100	10	890
1:110	10	1090
1:120	10	1190

3. Det ble tilsatt 50 µl av hver komplementfortynning til brønnene med buffer (4 brønner med hver fortynning).
4. Platen ble dekket med en bred blank tape, og inkubert på risting i 30 minutter ved 37 °C.
5. 50 µl 1% sensibiliserte saueblodceller ble tilsatt i hver brønn. Platen ble dekket med en bred blank tape og satt til inkubering på risting i 30 minutter ved 37 °C.
6. Platen ble sentrifugert ved ca 1500 rpm i 5 minutter.
7. 100 µl ble deretter overført fra hver brønn til brønner i en flatbunnet mikrotiterplate. 100 µl vann ble tilsatt i en brønn som blindprøve for absorbansmåling.
8. Platene ble sentrifugert ved ca 1500 rpm i 5 minutter for å fjerne eventuelle luftbobler.
9. Absorbansen ble målt som beskrevet under *F: Måling av absorbans*.
10. Lyseringsgraden ble bestemt som beskrevet under **Beregninger**. Den fortynningen som ga ca 50% lyse ble valgt til utføring av testen i *E: Utføring av testen*.

*E: Utføring av testen*

1. 50 µl av hver av fortynningene (2 paralleller av hver) ble overført til en mikrotiterplate med runde brønner.
2. 4 brønner ble tilsatt 50 µl veronal/BSA-buffer og 4 brønner ble tilsatt 100 µl destillert vann for henholdsvis kontroll og 100% lysekontroll.
3. Komplement ble tatt opp fra fryseren rett før bruk da det ødelegges raskt i romtemperatur. Det ble fortynnet til det forhold som ga ca 50 % lyse i

titreringskurven, og 50 µl av fortynningen ble raskt tilsatt hver brønn unntatt lysekontrollbrønnene.

4. Platen ble dekket med en bred blank tape for å unngå fordamping, og satt til inkubering på risting i 30 minutter ved 37 °C.
5. 50 µl 1% sensibiliserte saueblodceller ble tilsatt i hver brønn. Platen ble dekket med en bred blank tape og satt til inkubering på risting i 30 minutter ved 37 °C.
6. Platen ble sentrifugert ved ca 1500 rpm i 5 minutter.
7. 100 µl ble deretter overført fra hver brønn til brønner i en flatbunnet mikrotitrerplate. 100 µl vann ble tilsatt i en brønn som blindprøve for absorbansmåling.
8. Platene ble sentrifugert ved ca 1500 rpm i 5 minutter for å fjerne eventuelle luftbobler.
9. Absorbansen ble målt som beskrevet under *F: Måling av absorbans*.

#### *F: Måling av absorbans*

1. Absorbansen ble avlest ved 405 nm ved hjelp av dataprogrammet Softmax.

### **Beregninger**

#### *Lyseringsgrad*

Lyseringsgraden for komplement ble beregnet for å teste i hvor stor grad komplement alene har lysert blodcellene. Anbefalt lyseringsgrad i denne testen er ca 50%.

$$\text{Lyseringsgrad} = (\text{Abs}_{\text{kontroll}} / \text{Abs}_{\text{lysekontroll}}) \times 100\%$$

#### *Komplementfikserende effekt*

Komplementfikserende effekt ble beregnet for å bestemme prøvens effekt på komplementsystemet. Høy grad av komplementfiksering vil gi redusert hemolyse og lavere absorbans.

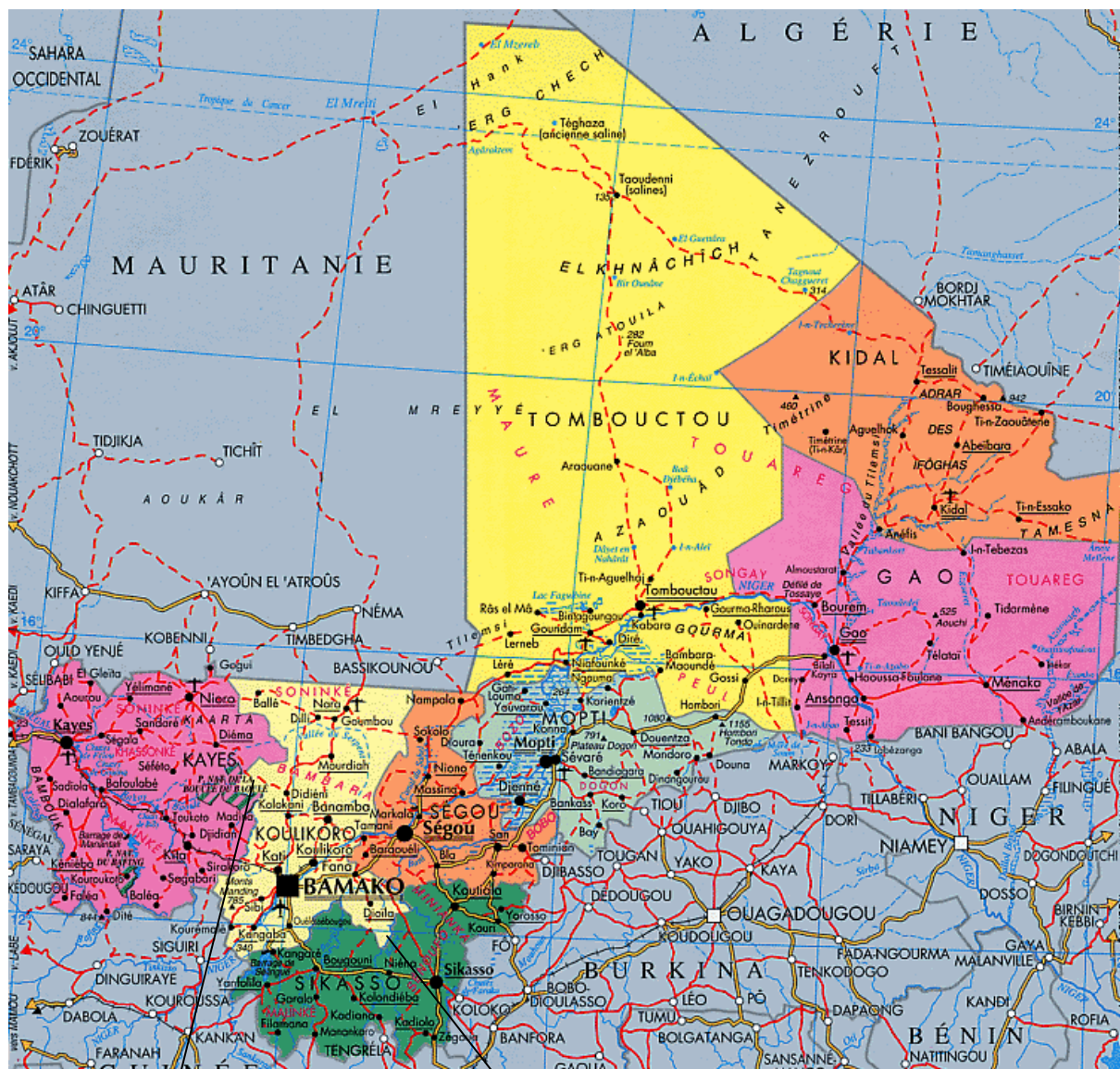
$$\text{Komplementfikserende effekt} = [(\text{Abs}_{\text{kontroll}} - \text{Abs}_{\text{prøve}}) / \text{Abs}_{\text{kontroll}}] \times 100\%$$



## 4.7 FELTARBEID I MALI

### 4.7.1 Etnofarmakologisk studie; healerintervjuer

Det ble utført to feltarbeidsturer der hensikten var å innhente informasjon om tradisjonell medisinsk bruk av *C.glutinosum*. Områdene som ble besøkt var Kolokani og Dioila, og tidsperioden var 21.januar til 2.februar 2006.



Kololani

Dioila

**Figur 4.7.1** Kart over Mali med feltarbeidsområdene markert (Izf.net).

I tillegg til anvendelsesområder for planten ble det registrert opplysninger om navn, alder, etnisk gruppe og om praksisens omfang og erfaring. Healerne ble spurt direkte om de benyttet planten, og evt hvilke deler, mot hva og i hvilken dosering.

Veileder under feltarbeidet var professor Drissa Diallo. Han fungerte også som tolk da det lokale språket er bambara både i Kolokani og i Dioila, det samme som Dr. Diallo snakker. Som takk for å ha latt seg intervjuet mottok hver healer 2000 CFA (20-25 kroner) samt 10 kolanøtter.

### 4.7.2 Innsamlig av plantemateriale

Mesteparten av materialet av småbladet *C.glutinosa* ble samlet inn i Dioiladistriktet under feltarbeid i januar og februar 2006, men en bunt ble også kjøpt på medisinskeplantemarkedet på Medinamarkedet i Bamako januar 2006. Alle de innsamlede bladene kom fra ett stort tre, noe som er uvanlig å finne når det gjelder små blader.

Bladene ble lufttørket innendørs på DMT i noen døgn, og deretter pulverisert i morter. Vekten av materialet det ble jobbet videre med var 150 g pulver av små blader.

Når det gjelder storbladet *C.glutinosa* ble det ikke samlet inn noe mer materiale. Det ble jobbet videre med tidligere ekstrakter.

## **5 RESULTAT OG DISKUSJON, SMÅ BLADER**

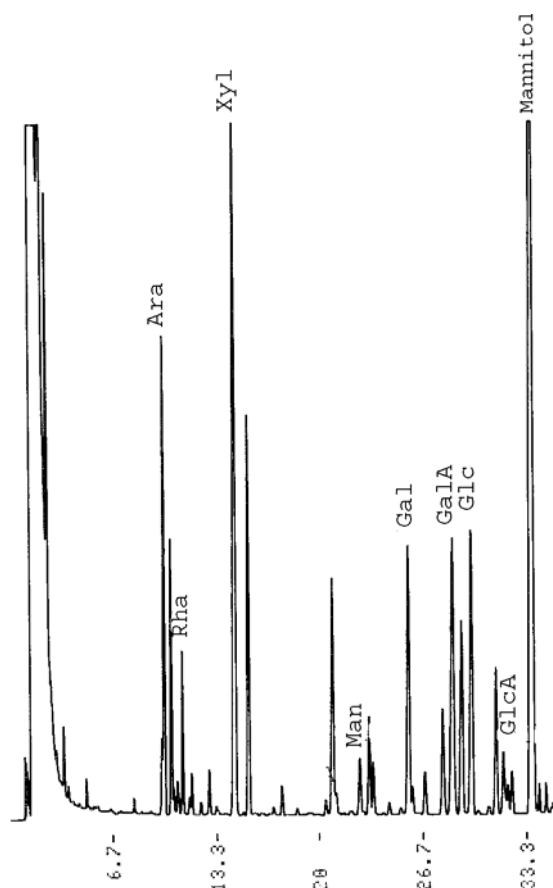
### **5.1 ISOLERING AV OG ANALYSER UTFØRT PÅ RÅEKSTRAKTER**

#### **5.1.1 Ekstraksjon med vann**

Ekstraksjonene ble utført ved DMT i Mali. Plantematerialet var en blanding av blader kjøpt på medisinsplantemarkedet i Bamako og blader innhøstet på feltarbeid i Dioila i januar og februar 2006. 198,43 g knust plantemateriale ble først ekstrahert med diklormetan, metanol og etanol. Deretter ble materialet tørket, ytterligere knust og veid på nytt. 74,66 g materiale ble så ekstrahert med vann, først ved 50 °C og deretter ved 100 °C. Vannekstraktene ble kalt henholdsvis CgSRå50 og CgSRå100. Ekstraktene ble dampet inn på rotavapor. CgSRå50 ble frysetørret mens CgSRå100 på grunn av tidsmangel ble frosset på vanlig måte for transport til Norge. En del av 50-graders ekstraktet var ikke fullstendig tørt, og det dannet seg mugg. Denne delen ble ikke benyttet i videre analyse.

#### **5.1.2 Metanolyse og GC på råekstrakt**

CgSRå50 var svært farget og viskøs, og ble derfor først dialysert, sentrifugert, filtrert. Deretter ble monosakkaridinnholdet i vannekstraktet CgSRå50 bestemt kvantitativt og kvalitativt ved hjelp av metanolyse, TMS-derivatisering og GC (metode 4.3.1.1-4.3.1.3). Kjent mengde mannitol ble tilsatt som intern standard for å få relative retensjonstider, samt for å muliggjøre kvantitativ bestemmelse av monosakkaridinnhold. Det ble benyttet tidligere kjørte standarder av de ulike monosakkaridene i blanding for å identifisere de ulike monosakkaridene i prøvechromatogrammet ut fra sammenlikning av relative retensjonstider i forhold til intern standard. Intern standard korrigerer for variasjoner i betingelsene i systemet.



**Figur 5.1.1** Gasskromatografiresultat av monosakkaridbestemmelse for CgS50Rå

I gasskromatogrammet (figur 5.1.1) fremkommer det flere topper enn de som ble brukt til å beregne kvantitative mengder av monosakkaridene. Dette skyldes at hvert monosakkarid kan gi opphav til flere topper fordi de kan anta forskjellige konfigurasjoner og konformasjoner i løsning. Man kan ha en blanding av furanose- og pyranoseform, som igjen kan ha enten  $\alpha$ - eller  $\beta$ -konfigurasjon. Monosakkaridene kan også ha åpen kjedeform. Uronsyrer kan danne anhydrosukker, eller foreligge som metylestre. Da det alltid vil innstille seg en likevekt mellom de ulike formene, vil arealforholdet mellom toppene fra de ulike formene være nyttig i identifikasjonsprosessen. Toppene kan også skyldes forurensninger i prøven. Kvalitative og kvantitative beregninger fra gasskromatogrammet kan settes opp i tabell, og brukes for å sammenlikne monosakkaridsammensetningen i ulike fraksjoner. Tabell 5.1.1 viser prosentvis innhold av de ulike monosakkaridene i CgS50Rå, samt totalt monosakkaridinnhold i prøven.

**Tabell 5.1.1** Tabellen viser prosentvis fordeling av monosakkarider i råekstraktet i forhold til total mengde sukker. Nederste linje viser prøvens prosentvise innhold av karbohydrat i forhold til innveid mengde frysetørket prøve.

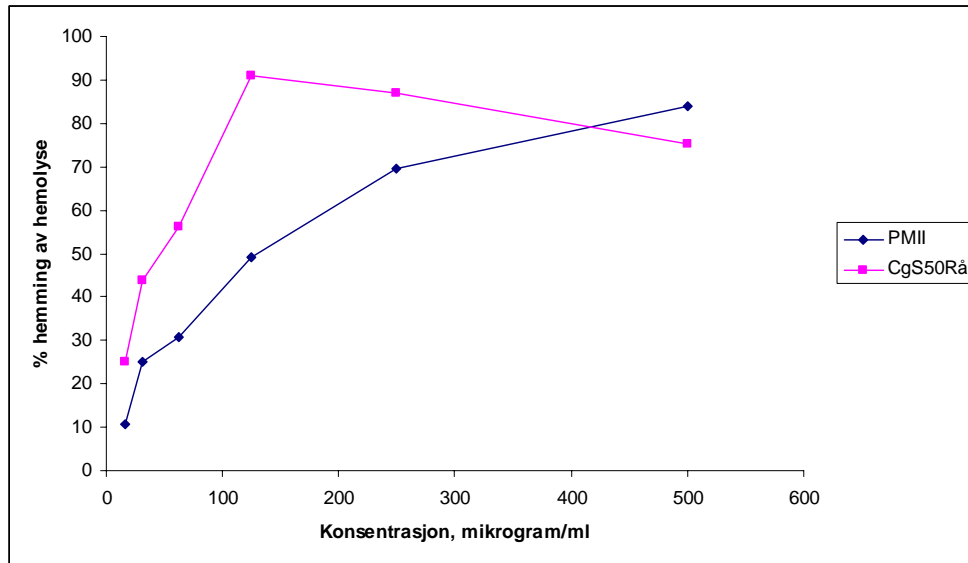
Monosakkarid	CgS50Rå
Ara	10,5
Rha	2,7
Fuc	0,0
Xyl	24,0
Man	2,3
Gal	12,1
Glc	14,0
GlcA	5,8
GalA	28,5
<b>Totalt karbohydratinnhold</b>	<b>39,2%</b>

CgS50Rå har et ganske høyt innhold av galakturonsyre, noe som kan tyde på innhold av pektinkjeder. Høyt innhold av xylose kan komme fra xylankjeder eller xyloglukaner i kombinasjon med glukose, og arabinose og galaktose kan komme fra arabinogalaktaner. Tilstedeværende rhamnose kan sammen med galakturonsyre kan stamme fra rhamnogalakturonaner.

### 5.1.3 Biologisk aktivitet

#### 5.1.3.1 Komplementfikseringstesten

Komplementfikseringstesten (metode 4.6.1) ble utført på fraksjonene CgS50Rå for å undersøke biologisk aktivitet. Figur 5.1.2 viser fraksjonens aktivitet på komplementsystemet, sammenliknet med PMII som standard. Høye hemolyseverdier korrelerer til høy komplementfikserende aktivitet.



**Figur 5.1.2** Komplementfikserende aktivitet for CgS50Rå, sammenliknet med PMII. Begge prøvene er løst i veronalbuffer.

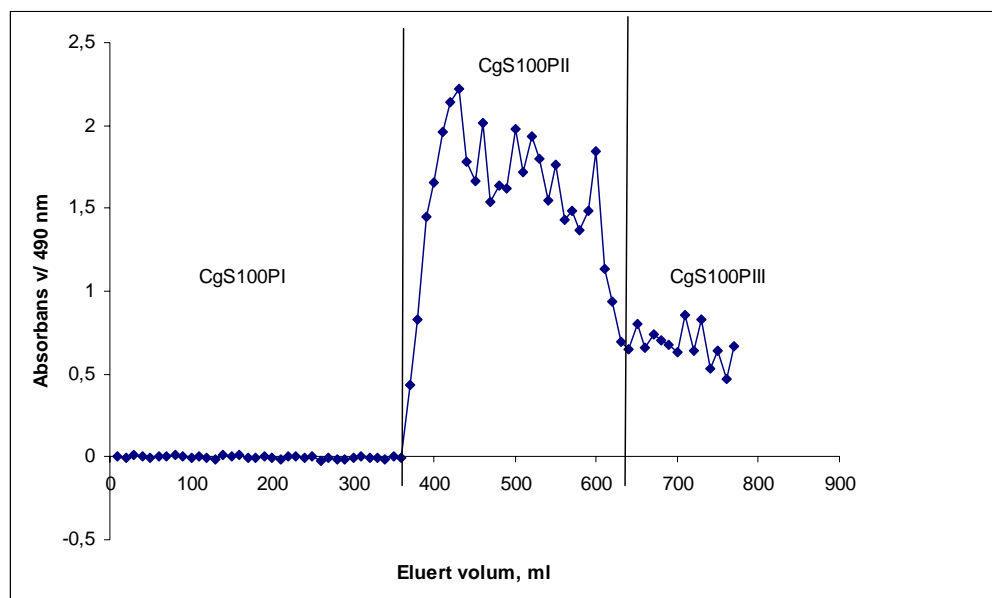
CgS50Rå viser en høyere aktivitet enn PMII ved lave konsentrasjoner, men kurven synker litt etter konsentrasjon på 125 mikrogram/ml. 50% hemming av hemolyse (ICH50) oppnås allerede ved en konsentrasjon på mellom 31,3 og 62,5 mikrogram/ml, mens PMII har ICH50 ved 125 mikrogram/ml.

Resultatet fra metanolyse og GC viser at fraksjonen inneholder en del arabinose, xylose, glukose, galaktose og galakturonsyre, samt litt rhamnose (tabell 6.1.1). Dette kan tyde på innhold av pektiner av typene rhamnogalakturonaner (Rha, Gal A, Ara) og homogalakturonan (Gal A), samt arabinogalaktaner (Ara, Gal) og hemicelluloser som xylaner (Xyl) og xyloglukaner (Xyl og Glc), strukturer som tidligere er vist å ha komplementfikserende aktivitet (Yamada og Kiyohara 1999).

## 5.2 SEPARASJON PÅ BIOGEL P-6 OG ANALYSE UTFØRT PÅ NYE FRAKSJONER

Molekylene i CgRå100 ble separert etter minkende størrelse på en Biogel-P6-kolonne.

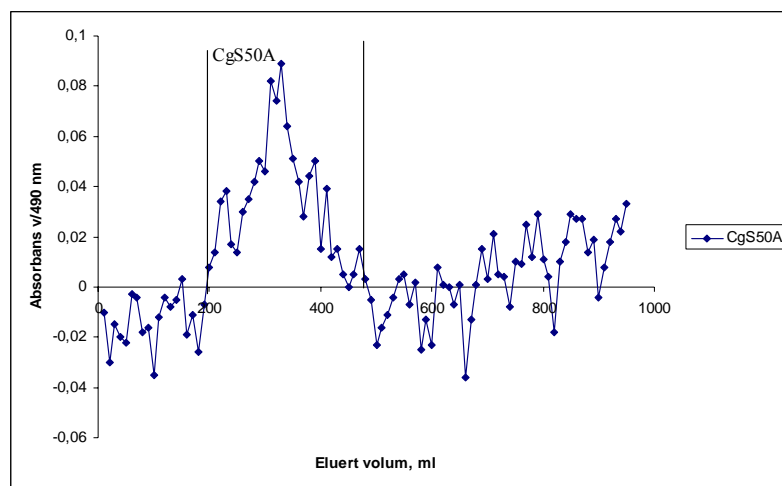
Prøveløsningen ble sentrifugert på grunn av mye grums, og supernatanten ble filtrert og påsatt kolonnen i 100-ml porsjoner. Det ble eluert med destillert vann, og fraksjonene ble samlet opp i rør à 10 ml. På bakgrunn av resultatet fra fenol-svovelsyretesten (metode 4.3.2) ble fraksjonene samlet sammen til tre: CgS100PI, CgS100PII og CgS100PIII (figur 5.2.1). Det ble bestemt å gå videre med CgS100PII da det ble antatt at polysakkaridene ville befinne seg i dette molekylvektintervallet. CgS50Rå ble ikke separert på Biogel-P6 pga høy viskositet. Ekstraktet ble istedenfor sentrifugert, filtrert og dialysert, som beskrevet tidligere i 5.1.1. Det ble ikke utført noen analyser på disse fraksjonene.



**Figur 5.2.1** Karbhydratprofil av CgS100PII etter eluering med destillert vann på Biogel-P6-kolonne

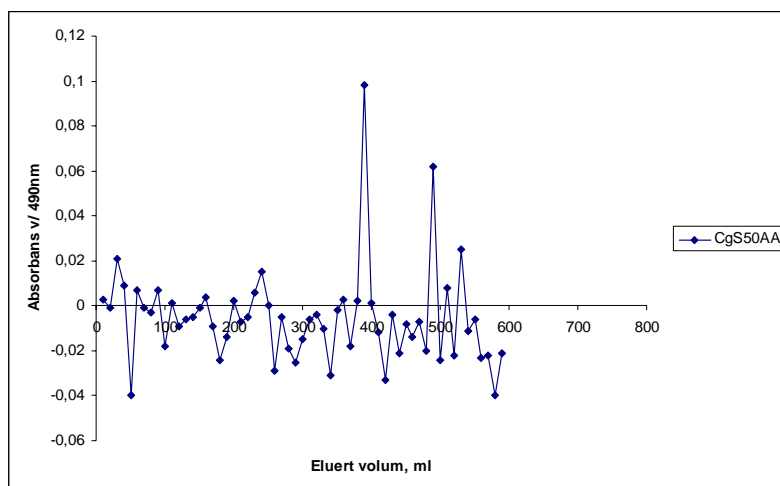
### 5.3 SEPARASJON PÅ DEAE SEPHAROSE FAST FLOW OG ANALYSER PÅ NYE FRAKSJONER

Polysakkaridene i CgSRå50 og CgS100PII ble deretter separert etter økende surhetsgrad på ionebytterkolonne med DEAE Sepharose fast flow (metode 4.2.4.1). Det ble eluert med henholdsvis destillert vann, NaCl-gradient fra 0 - ca 1 M, og 2 M NaCl. Eluatene fra destillertvannkjøring ble samlet opp i en kolbe, inndampet på rotavapor og kalt henholdsvis CgS50N og CgS100N (N for neutral). Eluatet fra NaCl-gradientkjøringen ble samlet opp i rør på fraksjonssamler, og de aktuelle fraksjonene ble slått sammen til én på bakgrunn av resultatet fra fenol-svovelsyretesten (metode 4.3.2) (figur 5.3.1 og 5.3.3). Disse ble kalt CgS50A og CgS100A (A for acid). Når det gjelder eluatet fra 2 M NaCl-kjøringen av 50 °C-ekstraktet, ble dette først samlet opp i fraksjonsrør, men deretter kastet da fenol-svovelsyretesten (metode 4.3.2) ikke viste spor av polysakkarider (figur 5.3.2). For 100 °C-ekstraktet ble fraksjonen tatt vare på og kalt CgS100AA (figur 5.3.4).

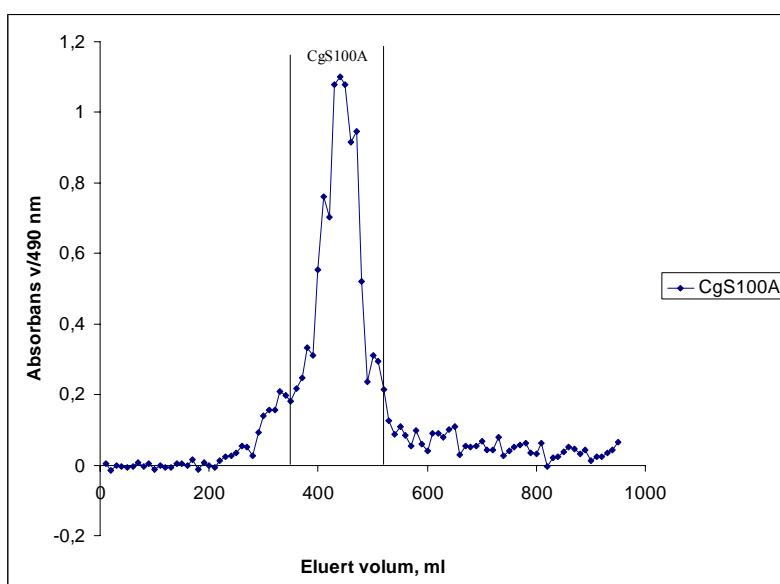


**Figur 5.3.1** Karbohydratprofil etter fenol-svovelsyretest på CgS50A

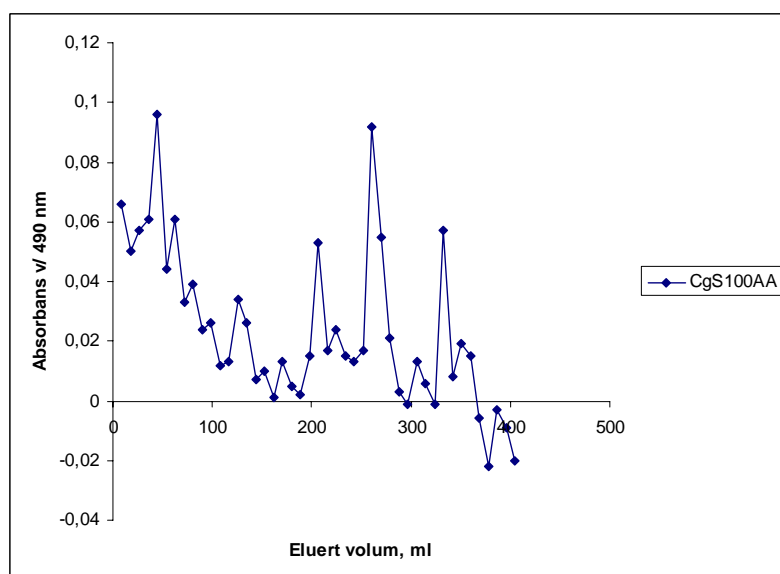




**Figur 5.3.2** Karbohydratprofil etter fenol-svovelsyretest på CgS50AA



**Figur 5.3.3** Karbohydratprofil etter fenol-svovelsyretest på CgS100A

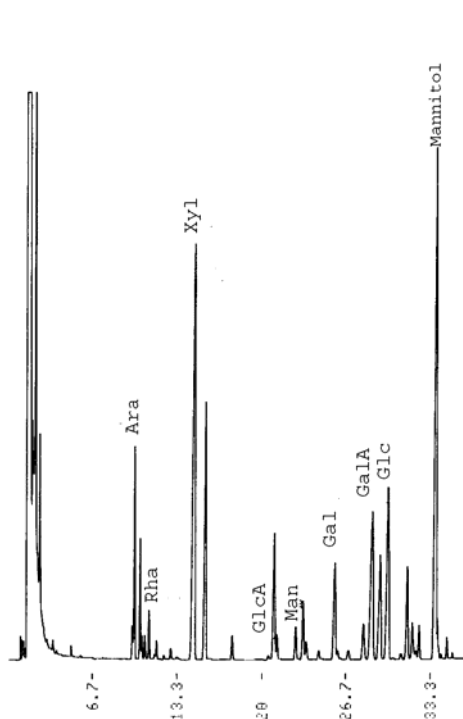


**Figur 5.3.4** Karbohydratprofil etter fenol-svovelsyretest på CgS100AA

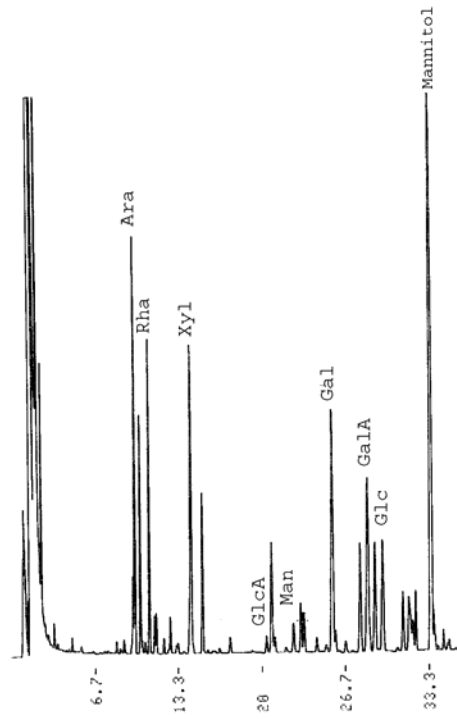
### 5.3.1 Kvantitativ og kvalitativ bestemmelse av monosakkaridinnhold

#### 5.3.1.1 Metanolyse og GC

Monosakkaridsammensetningen ble deretter bestemt kvantitativt og kvalitativt ved metanolyse, TMS og gasskromatografi (metode 4.3.1.1-4.3.1.3).



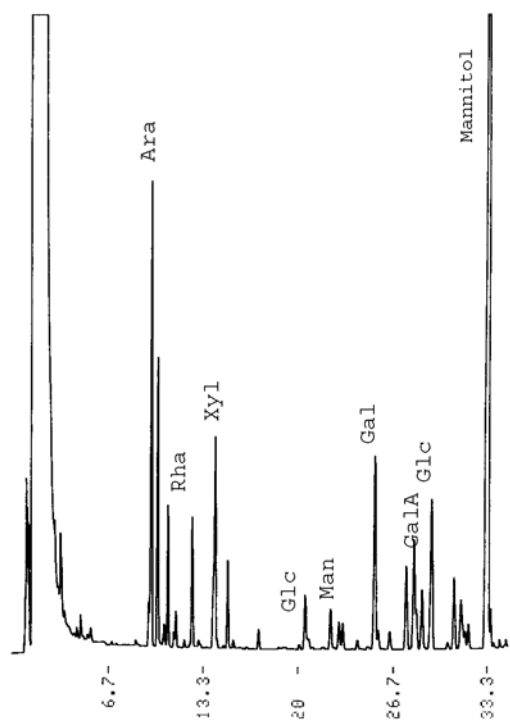
**Figur 5.3.5** Gasskromatografiresultat av monosakkaridbestemmelse for CgS50N



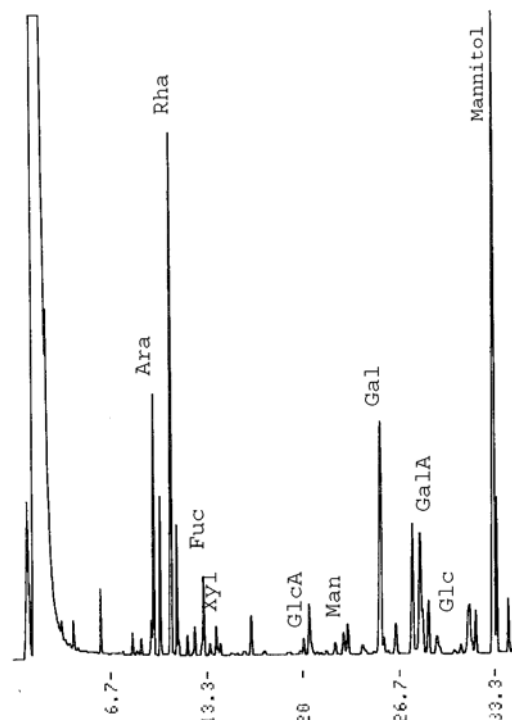
**Figur 5.3.6** Gasskromatografiresultat av monosakkaridbestemmelse for CgS50A

**Tabell 5.3.1** Tabellen viser prosentvis fordeling av monosakkarider i polysakkaridfraksjonene i forhold til total mengde sukker. Nederste linje viser prøvenes prosentvise innhold av karbohydrat i forhold til innveid mengde frysetørket prøve.

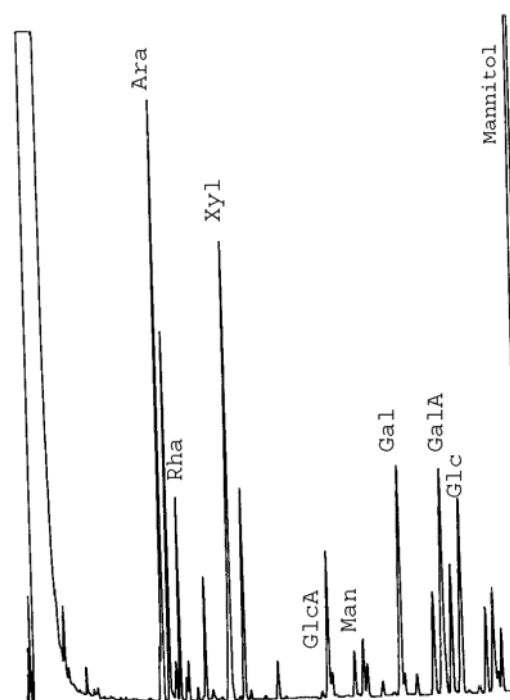
Monosakkarid	CgS50N	CgS50A
Ara	8,5	14,1
Rha	1,4	7,4
Fuc	0	0
Xyl	31,3	15,7
Man	2,4	2,1
Gal	8,3	18,2
Glc	17,1	8,8
GlcA	2,2	6,7
GalA	29,1	26,9
<b>Totalt karbohydratinhold</b>	<b>63,9%</b>	<b>58,1%</b>



**Figur 5.3.7** Gasskromatografiresultat av monosakkaridbestemmelse for CgS100N



**Figur 5.3.8** Gasskromatografiresultat av monosakkaridbestemmelse for CgS100A



**Figur 5.3.9** Gasskromatografiresultat av monosakkaridbestemmelse for CgS100AA

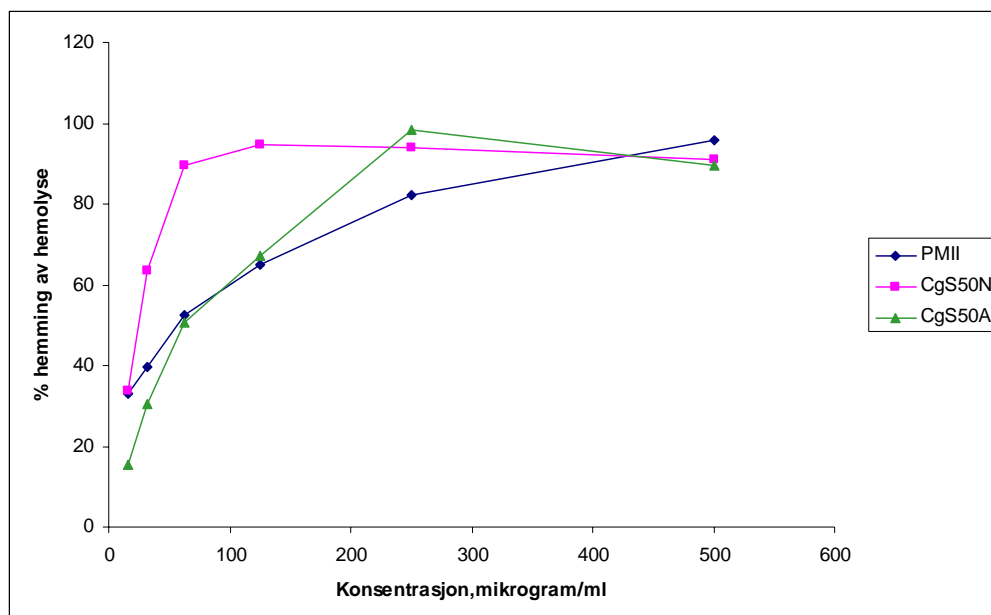
**Tabell 5.3.2** Tabellen viser prosentvis fordeling av monosakkarider i polysakkaridfraksjonene i forhold til total mengde sukker. Nederste linje viser prøvenes prosentvise innhold av karbohydrat i forhold til innveid mengde frysetørket prøve.

Monosakkarid	CgS100N	CgS100A	CgS100AA
Ara	23,2	14,4	18,8
Rha	4,6	18,4	3,9
Fuc	0	0	0
Xyl	14,7	2,0	19,1
Man	3,1	1,3	2,4
Gal	16,3	23,8	13,6
Glc	13,7	2,8	11,7
GlcA	2,7	7,9	2,2
GalA	21,6	29,3	28,3
<b>Totalt karbohydratinnhold</b>	<b>21,9%</b>	<b>57,6%</b>	<b>31,3%</b>

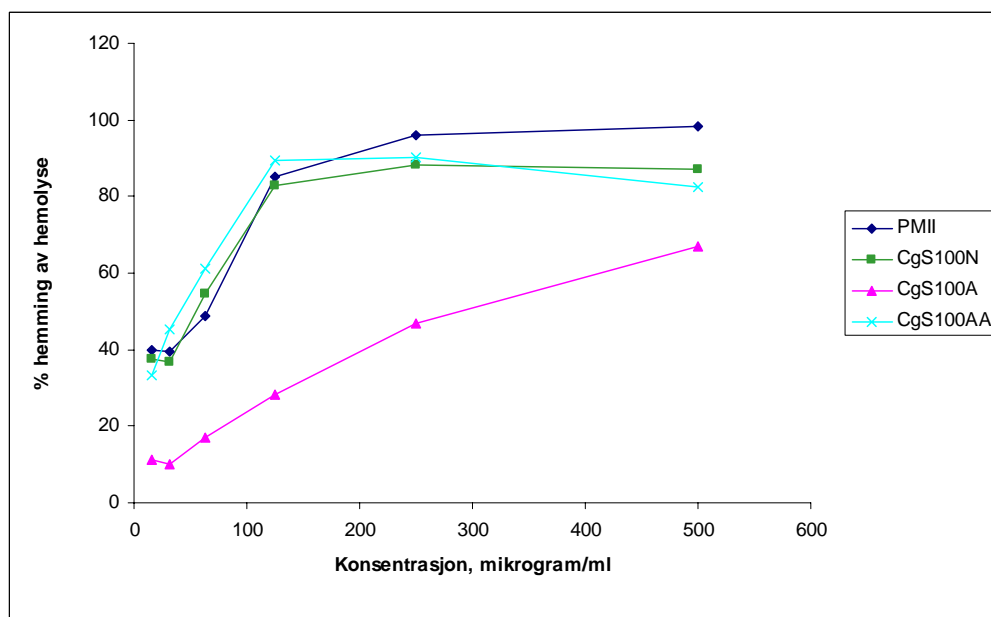
### 5.3.2 Biologisk aktivitet

#### 5.3.2.1 Komplementfikseringstesten

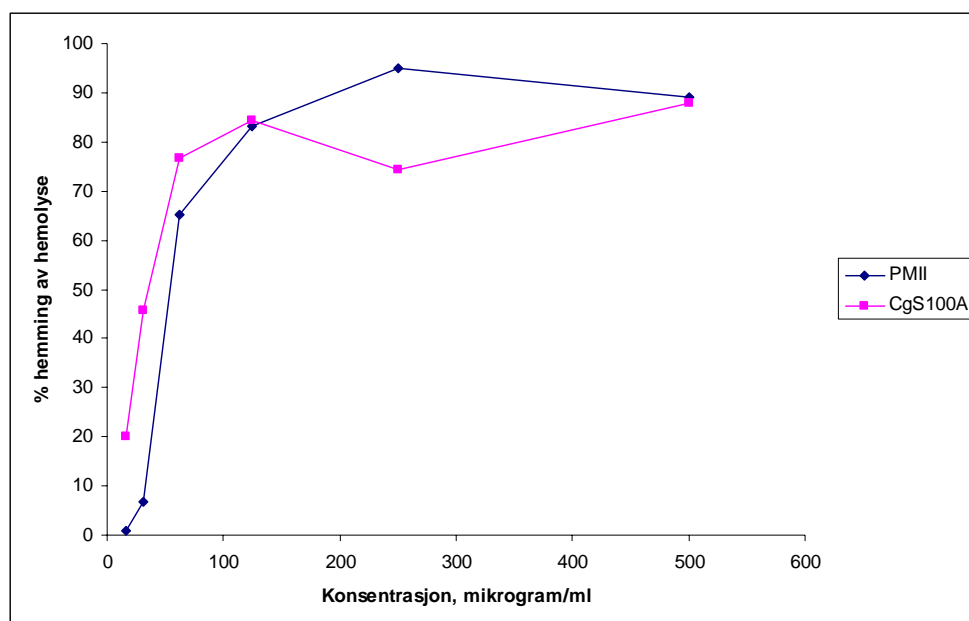
Komplementfikseringstesten (metode 4.6.1) ble utført på fraksjonene CgS50N, CgS50A, CgS100N, CgS100A og CgS100AA for å undersøke biologisk aktivitet. Figur 5.3.10, 5.3.11 og 5.3.12 viser de ulike fraksjonenes aktivitet på komplementsystemet, sammenliknet med PMII som standard. Høye hemolyseverdier korrelerer til høy komplementfikserende aktivitet. CgS100A viste en aktivitet langt lavere enn de andre fraksjonene (figur 5.3.11), noe som sannsynligvis skyldes stoffets dårlige løselighet i veronalbuffer. Det ble derfor på et senere tidspunkt gjort en ny test, denne gangen med både stoff og standard løst i DMSO (figur 5.3.12). Resultatene viser at alle testede fraksjoner har en aktivitet tilsvarende som hos standarden PMII.



**Figur 5.3.10** Komplementfikserende aktivitet for CgS50N og CgS50A, sammenliknet med PMII. Alle prøver er løst i veronalbuffer.



**Figur 5.3.11** Komplementfikserende aktivitet for CgS100N, CgS100A og CgS100AA, sammenliknet med PMII. Alle prøver er løst i veronalbuffer.



**Figur 5.3.12** Komplementfikserende effekt for CgS100A, sammenliknet med PMII. Begge prøver er løst i DMSO.

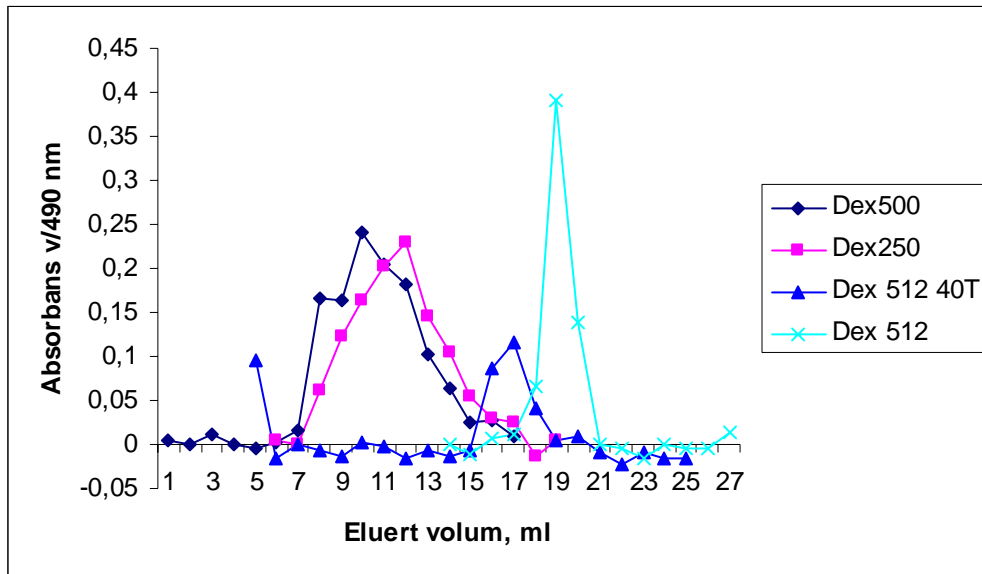
CgS50N viser en høyere aktivitet enn PMII ved lave konsentrasjoner, men kurven flater raskt ut. 50% hemming av hemolyse oppnås allerede ved en konsentrasjon på mellom 15,6 og 31,3 mikrogram/ml. CgS50A stiger noe brattere enn PMII, men har en lik ICH50-verdi på ca 62,5. CgS100N og CgS100AA har begge en ICH50-verdi på ca 62,5 mikrogram/ml, det samme som PMII. Når det gjelder CgS100A fra forsøk nummer to viser denne høyere aktivitet enn PMII ved de laveste konsentrasjonene, og de to fraksjonene har en ICH-verdi på henholdsvis ca 31,3 for CgS100A og ca 62,5 for PMII.

Resultatet fra metanolyse og GC viser at alle fraksjonene inneholder en del arabinose (noe mer i 100-graders ekstraktene enn i 50-graders ekstraktene, minst i CgS50N), litt rhamnose (mest i CgS100A), galaktose og galakturonsyre (tabell 5.3.1 og 5.3.2). Dette kan tyde på innhold av pektiner av typene rhamnogalakturonaner og homogalakturonan, samt arabinogalaktaner, strukturer som tidligere er vist å ha komplementfikserende aktivitet (Yamada og Kiyohara 1999).

### 5.3.3 Bestemmelse av molekylvekt, FPLC

Fraksjonene CgS50N, CgS50A, CgS100A og CgS100AA ble separert analytisk etter synkende molekylvekt. Fenol-svovelsyretesten (metode 4.3.2) ble benyttet for å finne ut ved hvilke volum polysakkaridene ble eluert ut (start, toppunkt og slutt), og deretter ble disse

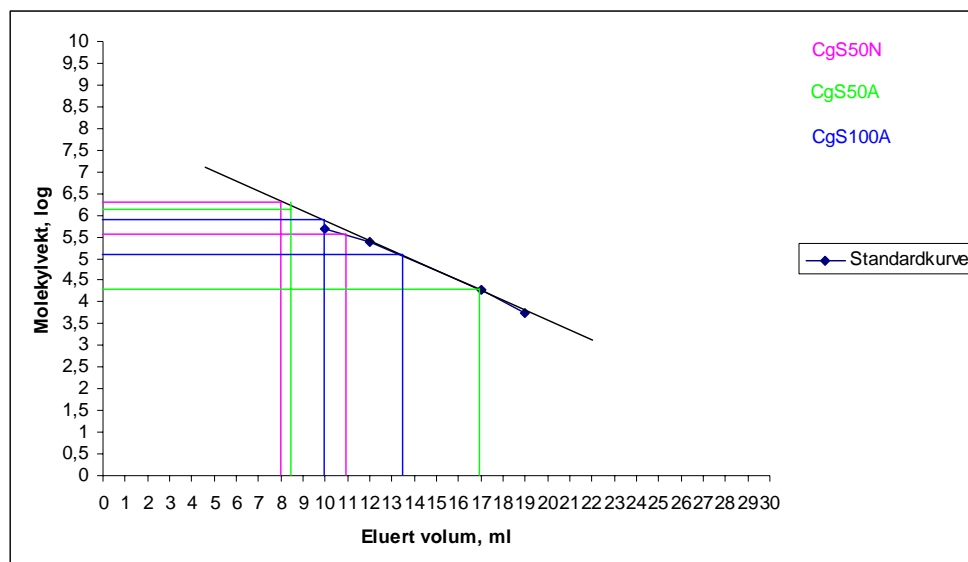
verdiene plottet mot en semilogaritmisk standardkurve laget av dekstraner med kjent molekylvekt (figur 5.3.14). Resultatet fremkommer i figur 5.3.14 og tabell 5.3.3.



**Figur 5.3.13** Grafene viser hvordan de fire dekstranstandardene ble eluert ut.

Toppunktene, som illustrerer hvor hovedtyngden av karbohydratene ble eluert ut, ble benyttet til å lage en standardkurve. Mellom ca 10 og 20 ml er kurven lineær, men områdene på utsidene kan man ikke si noe om. Molekylvekten til molekyler i prøvene som kommer ut utenfor dette området kan man ikke si noe mer om enn at de er større enn molekylene fra den mest høymolekylære standarden, i dette tilfellet 475 kDa, eller mindre enn molekylene i den mest lavmolekylære standarden.

De inntegnede strekene viser ved hvilke ml karbohydratene ble eluert ut, toppunkt og sluttunkt, fra grafene etter fenol-svovelsyretesten. Startpunkter er ikke tegnet inn da disse kom i voidvolumet.



**Figur 5.3.14** Molekylvekten i de ulike fraksjonene ble beregnet ut fra en standardkurve laget etter kjøring av dekstraner med kjent molekylvekt. Cgs100AA er ikke tegnet inn på grafen da alle karbohydratene i denne fraksjonen kom ut i voidvolumet.

**Tabell 5.3.3** Molekylvekter for de ulike fraksjonene, omregnet fra logaritmisk tall avlest på graf i figur 5.3.14.

Fraksjon	Laveste Mw, Da	Høyeste Mw, Da	Hovedtyngde, Da
CgS50N	300 000	$\geq 475\ 000$	$\geq 475\ 000$
CgS50A	20 000	$\geq 475\ 000$	$\geq 475\ 000$
CgS100A	125 000	$\geq 475\ 000$	$\geq 475\ 000$
CgS100AA	475 000	$\geq 475\ 000$	$\geq 475\ 000$

Alle fraksjonene er høymolekylære, og inneholder molekyler som kommer ut før den mest høymolekylære standarden. Med det utstyret som ble benyttet er det ikke mulig å si noe mer enn at molekylvekten er høyere eller lik molekylvekten til den mest høymolekylære standarden, 475 kDa.

## 5.3.4 Strukturoppklaring

### 5.3.4.1 Bestemmelse av bindingsforhold i fraksjonene

Bindingsforholdene mellom monosakkaridene i de isolerte polysakkaridene etter separasjon på DEAE-ionebytter ble bestemt ved hjelp av karboksylsyre-reduksjon og påfølgende metylering (metode 4.4.1-4.4.5) og GC-MS (metode 4.4.6). Tabell 5.3.4 viser det prosentvise innholdet av de ulike monosakkaridene etter bindingstype. Tallene er fremkommet etter bearbeidelse av kromatogrammene, samt bruk av prosentvis totalinnhold av de ulike monosakkaridene funnet ved metanolyse, TMS-derivatisering og GC (metode 4.3.1.1-4.3.1.3)



(tabell 5.3.1 og 5.3.2) for de aktuelle prøvene. Noen av toppene i kromatogrammet overlapper hverandre slik at mengde beregnet ut fra areal ikke er helt korrekt.

**Tabell 5.3.4** Tabellen viser prosentvis innhold av de ulike monosakkaridene basert på bindingsforhold, beregnet ut fra arealer i GC-MS-kromatogram og GC-kromatogram.

Monosakkarider og deres bindingstype	CgS50N	CgS50A	CgS100N	CgS100A	CgS100AA
<b>T Araf</b>	4,5	9,4	6,5	7,7	10,0
<b>1,3 Araf</b>	1,4	1,8	1,1	0,4	1,3
<b>1,5 Araf</b>	1,8	1,8	4,5	3,0	7,6
<b>1,2,5 Ara</b>	Muligens**	Muligens**	Muligens*	Muligens*	Muligens*
<b>1,3,5 Araf</b>	0,7	1,1***	11,1	3,3	
<b>T Xyl</b>	30,9	15,4	14,7	1,7	19,1
<b>1,4 Xyl</b>	0,4			0,3	
<b>1,3 Xyl</b>		0,3			
<b>1,2,4 Xyl</b>	Muligens**	Muligens**	Muligens*	Muligens*	Muligens*
<b>T Rha</b>		0,5		2,8	3,3
<b>1,2 Rha</b>	1,2	5,6	4,6	15,1	0,6
<b>1,3 Rha</b>		0,3		0,5	
<b>1,2,4 Rha</b>	0,2	1,0	Muligens*	Muligens*	Muligens*
<b>T Fuc</b>	Spor	Spor	Spor	Spor	Spor
<b>T Gal</b>	2,3***	2,3***			
<b>1,6 Gal</b>	1,8	2,0***	0,8		
<b>1,3 Gal</b>		3,9	5,3	23,8	13,6
<b>1,4 Gal</b>		Spor			
<b>1,2,4 Gal</b>		Mulig spor**			
<b>1,3,6 Gal</b>	4,2	5,2	6,2		
<b>1,3,4,6 Gal</b>		4,7	4,0		
<b>T Glc</b>	1,3***	0,8***	1,6***	1,7***	3,6***
<b>1,4 Glc</b>	15,4	7,8	11,4	1,0	8,1
<b>1,2,4 Glc</b>		Mulig spor**			
<b>1,4,6 Glc</b>	0,3	0,2	0,8		
<b>T GalA</b>	0,6***	0,6***			
<b>1,4 GalA</b>	15,6	21,3	15,5	28,4	17,2
<b>1,3,4 GalA</b>	12,9	5,0	6,1	0,9	11,1
<b>T GlcA</b>	2,2***	6,7***	2,7***	7,9***	
<b>1,3' Apiose</b>		Spor		Spor	
<b>Totalt</b>	97,7	97,7	96,9	98,5	95,5

\* Når det gjelder 100-graders fraksjonene så kan en del topper skjules av en stor forurensningstopp.

\*\* Noe topper kommer tett, evt inni hverandre, og har liknende spektre. Det kan derfor være vanskelig å skille/identifisere alle topper. Dette gjelder spesielt 1,2 5 Ara og 1,2,4 Xyl

\*\*\* Stoffer som deler topp med et annet stoff, mengde beregnet ut fra mengder av viktige molekyllioner i kromatogrammet.

I den videre diskusjonen ses det på mulighetene for tilstedeværelse av de viktigste strukturelle plantepolysakkaridene; homogalakturonan, rhamnogalakturonan I og II, xylaner, arabinogalaktan I og II, xyloglukaner og stivelse. Flere av disse har vist å ha biologisk aktivitet (3.2.2).

### **Bindingsforhold CgS50N**

#### *Homogalakturonan*

Fraksjonen inneholder 1,4 Gal A (15,6%), noe som tyder på innhold av lineære homogalakturonankjeder. Relativt høyt innhold av 1,3,4 Gal A (12,9%) kan tyde på høy forgreningsgrad i 3-posisjon.

#### *Rhamnogalakturonan I (RG I)*

Rhamnose foreligger i form av 1,2 Rha (1,2%) og 1,2,4 Rha (0,2%), som sammen med 1,4 Gal A og 1,3,4 Gal A kan stamme fra rhamnogalakturonan type I.

#### *Rhamnogalakturonan II (RG II)*

Rhamnogalakturonan type II består i tillegg til 1,2 Rha, 1,4 Gal A og 1,3,4 Gal A av T Rha og T Ara (4,5%). Med unntak av T Rha finnes alle disse i denne fraksjonen.

#### *Stivelse/forurensning*

Innhold av 1,4 Glc (15,4%) og T Glc (1,3%) kan tyde på innhold av stivelse og/ eller mindre forurensning fra cellulose.

#### *Xylaner*

Denne strukturen finnes det sannsynligvis ikke mye i CgS50A. Det er svært lite 1,4 Xyl (0,4%), og det kan ikke sies med sikkerhet om 1,2,4 Xyl er tilstede.

### *Arabinogalaktan I (AG I)*

Om det i det hele tatt er noe av denne strukturen er det i så fall ikke mye. Det er riktignok noe T Gal (2,3%), men verken 1,4 Gal eller 1,3,4 Gal er funnet. T Ara, 1,5 Ara (1,8%) og 1,3,5 Ara (0,7%) er det imidlertid noe av, men disse molekylerne kan stamme fra andre strukturer.

### *Arabinogalaktan II (AG II)*

CgS50A inneholder en del galaktose i form av 1,3,6 Gal (4,2%). Det kan bety innhold av arabinogalaktan II, men i så fall burde fraksjonen også ha inneholdt 1,3 Gal, noe den tilsynelatende ikke gjør. T Gal, T Ara og 1,3 Ara (1,4%) er imidlertid til stede.

### *Xyloglukaner*

Innholdet av xylose, i form av T Xyl (30,9%), er høyt, og tyder sammen med 1,4 Glc på innhold av xyloglukaner.

### ***Oppsummering CgS50N***

Ut fra de bindingstyper som er observert i kromatogrammet ser det ut til at CgS50N hovedsakelig inneholder sterkt forgrenet homogalakturonan, xyloglukaner, rhamnogalakturonan I, stivelse samt muligens arabinogalaktan II og rhamnogalakturonan II.

### **Bindingsforhold CgS50A**

#### *Homogalakturonan*

Den sure fraksjonen inneholder relativt store mengder 1,4 Gal A (21,3%), noe som tyder på innhold av lineære områder bestående av homogalakturonan. Fraksjonen inneholder også noe T Gal A (0,6%), samt 1,3,4 Gal A (5,0%). Sistnevnte viser at galakturonankjeden har noen forgreninger i 3-posisjon.

#### *Rhamnogalakturonan I (RG I)*

Fraksjonen inneholder lite rhamnose, men det som er av 1,2 Rha (5,6%) og 1,2,4 Rha (1,0) tyder, sammen med 1,4 Gal A og 1,3,4 Gal A, på innhold av RG I. Dette er alternerende kjeder av Rha og Gal A med forgreninger i 4-posisjon på rhamnose og 3-posisjon på galakturonsyre.

#### *Rhamnogalakturonan II (RG II)*

1,4 Gal A og 1,3,4 Gal A kan også stamme fra RG II med forgreninger i 3-posisjon på noen av enhetene. På disse kjedene kan vi ha T Ara, T Rha og 1,2 Rha.

#### *Stivelse / forurensning*

Innhold av 1,4 Glc (7,8%), samt noe 1,4,6 Glc (0,2%) tyder på innhold av stivelse. 1,4 Glc kan også være forurensning fra cellulose.

#### *Xylaner*

Fraksjonen ser ikke ut til å inneholder 1,4 Xyl, så det er sannsynligvis ikke noe særlig xylaner i denne fraksjonen selv om det muligens finnes 1,2,4 Xyl.

#### *Arabinogalaktan I (AG I)*

Om det i det hele tatt er noe av denne strukturen er det i så fall ikke mye. Det er lite T Gal, kun spor av 1,4 Gal, ikke noe 1,3,4 Gal. T Ara, 1,5 Ara og 1,3,5 Ara er det imidlertid noe mer av. Men disse molekylene kan stamme fra andre strukturer.

#### *Arabinogalaktan II (AG II)*

Gal foreligger mest i bindingsforhold 1,3,6 Gal. Sammen med 1,3 Gal kan dette stamme fra AG II-strukturer, med kjeder av bundet 1,3 Gal med forgreninger i 6-posisjon til T- Gal, T- Ara eller 1,3 Ara.

#### *Xyloglukaner*

Innhold av store mengder T Xyl (15,4%) kan, sammen med 1,4 Glc, tyde på at fraksjonen inneholder xyloglukaner med hovedkjede av 1,4 Glc med T Xyl bundet i 6-posisjon. Spormengder av T-Fuc stammer sannsynligvis fra denne strukturen.

#### ***Oppsummering CgS50A***

Ut fra de bindingstyper som er observert i kromatogrammet ser det ut til at CgS50A inneholder hovedsakelig homogalakturonan, arabinogalaktan II, xyloglukaner, rhamnogalakturonan type I og muligens rhamnogalakturonan II.

Når det gjelder 100-graders ekstraktene må det kommenteres at en forurensningstopp ved ca 17.000 muligens skjuler flere monosakkarider, bla T Gal, 1,2 Rha, 1,2,4 Xyl og 1,2,5 Ara. Tallene i tabellen gir derfor ikke et helt riktig bilde på mengden av de ulike bindingstypene. Noen strukturer kan også være tilstede selv om det ikke ser sånn ut fra de oppnådde resultatene.

### **Bindingsforhold CgS100N**

#### *Homogalakturonan*

Tilstedeværelse av 1,4 Gal A (15,5%), samt en del 1,3,4 Gal A (6,1%), tyder på innhold av homogalakturonan med forgreninger i 3-posisjon.

#### *Rhamnogalakturonan I (RG I)*

RG I består av 1,4 Gal A, 1,3,4 Gal A, 1,2 Rha (4,6%) og 1,2,4 Rha. Av disse fremkommer alle unntatt 1,2,4 Rha i GC-MS-kromatogrammet, men denne kan være skjult i den store forurensningstoppen.

#### *Rhamnogalakturonan II (RG II)*

1,4 Gal A, 1,3,4 Gal A og 1,2 Rha kan også stamme fra RG II. RG II inneholder i tillegg T Ara (6,5%) og T Rha, av hvilke vi finner den første men ikke den andre.

#### *Stivelse / forurensning*

En god del 1,4 Glc (11,4%), samt noe 1,4,6 Glc tyder på et relativt stort innhold av stivelse og/ eller celluloseforurensning.

#### *Xylaner*

I denne fraksjonen er det ikke sett verken 1,4 Xyl eller 1,2,4 Xyl. 1,2,4 Xyl kan imidlertid være skjult i den store forurensningstoppen. Det er likevel lite sannsynlig at det finnes betydelige mengder av denne strukturen siden 1,4 Xyl ikke ser ut til å være tilstede.

#### *Arabinogalaktan I (AG I)*

AG I finner vi sannsynligvis ikke i 100-graders ekstraktet. Det finnes verken 1,4 Gal, T Gal eller 1,3,4 Gal i følge kromatogrammet.

*Arabinogalaktan II (AG II)*

Innhold av 1,3,6 Gal, 1,3 Gal tyder på AG II som kan ha sidekjeder av T Ara eller 1,3 Ara.

*Xyloglukaner*

Relativt store mengder T Xyl (14,7%) og 1,4 Glc, samt spormengder av T Fuc, stammer antakelig fra xyloglukaner.

***Oppsummering CgS100N***

Ut fra de bindingstyper som er observert i kromatogrammet ser det ut til at CgS100N inneholder hovedsakelig homogalakturonan, rhamnogalakturonan I, arabinogalaktan II samt xyloglukaner og muligens rhamnogalakturonan II.

**Bindingsforhold CgS100A**

*Homogalakturonan*

Store mengder 1,4 Gal A (28,4%) og små mengder 1,3,4 Gal A tyder på høyt innhold av homogalakturonankjeder med lite forgreninger.

*Rhamnogalakturonan I (RG I)*

Relativt store mengder av 1,2 Rha (15,1%) kan, sammen med 1,4 Gal A og 1,3,4 Gal A stamme fra RG I. Det mangler imidlertid synlig tilstedeværelse av 1,2,4 Rha, men denne kan være skjult i den store forurensningstoppen.

*Rhamnogalakturonan II (RG II)*

RG II består av 1,4 Gal A og 1,3,4 Gal A med sidekjeder av T Ara, T Rha og 1,2 Rha. I CgS100A finner vi alle disse bindingsforholdene, og dermed er det sannsynligvis RG II i fraksjonen.

*Stivelse / forurensning*

Lavt innhold av 1,4 Glc (1,0%) tyder på lite eller ikke noe innhold av stivelse eller forurensning fra cellulose. Det lille som er av 1,4 Glc kan stamme fra xyloglukaner.

#### *Xylaner*

Små mengder 1,4 Xyl (0,3%), samt T Xyl, kan stamme fra xylankjeder. Selv om det ikke er observert, kan det finnes 1,2,4 Xyl i forurensningstoppen som har T Ara bundet i 2-posisjon.

#### *Arabinogalaktan I (AG I)*

Denne strukturen finnes sannsynligvis ikke i denne fraksjonen basert på fravær av 1,4 Gal, T Gal og 1,3,4 Gal.

#### *Arabinogalaktan II (AG II)*

Høyt innhold av 1,3 Gal (23,8%) tyder, sammen med innhold av T Ara og 1,3 Ara på AG II-strukturer. Mangel på innhold av T Gal og 1,3,6 Gal strider imidlertid imot denne teorien.

#### *Xyloglukaner*

Et lavt innhold av T Xyl (1,7%) og 1,4 Glc kan stamme fra denne strukturen. Det samme gjelder spormengder av T Fuc.

#### ***Oppsummering CgS100A***

Ut fra de bindingstyper som er observert i kromatogrammet ser det ut til at CgS100A inneholder hovedsakelig homogalakturonan med lite forgreninger, rhamnogalakturonan I og xyloglukaner samt muligens rhamnogalakturonan II.

#### **Bindingsforhold CgS100AA**

##### *Homogalakturonan*

Relativt store mengder av både 1,4 Gal A (17,2%) og 1,3,4 Gal A (11,1%) tyder på høyt innhold av homogalakturonankjeder med mye forgreninger.

##### *Rhamnogalakturonan I (RG I)*

Små mengder av 1,2 Rha (0,6%) kan, sammen med 1,4 Gal A og 1,3,4 Gal A stamme fra RG I. Det mangler imidlertid synlig tilstedeværelse av 1,2,4 Rha, men denne toppen kan være skjult i den store forurensningstoppen.

*Rhamnogalakturonan II (RG II)*

RG II består av et skjelett av 1,4 Gal A og 1,3,4 Gal A med sidekjeder av T Ara (10%), T Rha (3,3%) og 1,2 Rha (0,6%). I CgS100A finner vi alle disse bindingsforholdene, og der et derfor stor sannsynlighet for at fraksjonenn inneholder RG II.

*Stivelse / forurensning*

Innhold av 1,4 Glc (8,1%) tyder på innhold av stivelse eller forurensning fra cellulose.

*Xylaner*

Om det i det hele tatt finnes noen xylaner i denne fraksjonen er det eventuelt kun spormengder. Verken 1,4 Xyl eller 1,2,4 Xyl er observert, men 1,2,4 Xyl kan være skjult i forurensningstoppen.

*Arabinogalaktan I (AG I)*

Denne strukturen finnes sannsynligvis ikke i denne fraksjonen basert på fravær av 1,4 Gal, T Gal og 1,3,4 Gal.

*Arabinogalaktan II (AG II)*

Høyt innhold av 1,3 Gal (13,6%) tyder, sammen med innhold av T Ara og 1,3 Ara på AG II-strukturer. Mangel på innhold av T Gal og 1,3,6 Gal strider imidlertid imot denne teorien.

*Xyloglukaner*

Et høyt innhold av T Xyl (19,1%) og 1,4 Glc (8,1%) kan stamme fra denne strukturen. Det samme gjelder spormengder av T Fuc.

***Oppsummering CgS100AA***

Ut fra de bindingstyper som er observert i kromatogrammet ser det ut til at CgS100AA inneholder hovedsakelig sterkt forgrenet homogalakturonan, rhamnogalakturonan I og xyloglukaner, samt muligens rhamnogalakturonan II.

**Ikke-metylerte fraksjoner**

Det ble ikke funnet nativt metylerte forbindelser i noen av fraksjonene.



### Kvantitativ og kvalitativ bestemmelse av monosakkaridinnhold etter karboksylsyrrereduksjon

Etter karboksylsyrrereduksjonen (metode 4.4.1) ble det foretatt metanolyse og TMS-derivatisering før analyse med GC (metode 4.3.1.1 – 4.3.1.3) for å se hvor stor andel av uronsyrene som var blitt redusert. Resultatene (tabell 5.3.4 og 5.3.5 sammenliknet med tabell 5.3.1 og 5.3.2) viste at Glc A ble så godt som fullstendig redusert til Glc, mens mengde Gal A ikke ble endret i like stor grad. Dette kan delvis forklares ut fra at Glc A sitter lengre ut i molekylet og derfor er mer utsatt for reduksjon enn Gal A, som i stor grad utgjør skjelettet. Men samtidig ser man at reduksjonen i Gal A er mye mindre enn forventet, og også lav sett i forhold til den store økningen i Gal. Mellom disse burde det vært en bedre korrelasjon. Det er usikkert hvorfor man har fått slike resultater, men mulige forklaringer kan være

1. at Gal A toppen er så stor at den kommer utenfor det standardiserte området med den konsekvens at ikke hele toppens areal er tatt med.
2. at bruk av ultralydbad (eller andre mekaniske hendelser) kan ha ødelagt noen bindinger, noe som vil påvirke prosentfordelingen. Ved å sammenlikne tabell 5.3.1 med tabell 5.3.4, og tabell 5.3.2 med tabell 5.3.5, ser man at også mengden av andre sukre enn Gal, Gal A, Glc og Glc A er endret signifikant.

**Tabell 5.3.4** Tabellen viser prosentvis fordeling av monosakkarider i polysakkaridfraksjonene i 50-graders ekstraktet i forhold til total mengde sukker. Nederste linje viser prøvenes prosentvise innhold av karbohydrat i forhold til innveid mengde frysetørket prøve.

<b>Monosakkarid</b>	<b>CgS50Nred</b>	<b>CgS50Ared</b>
Ara	5,9	11,1
Rha	1,0	3,6
Fuc	0,0	0,0
Xyl	23,9	11,6
Man	0,8	0,7
Gal	29,3	43,3
Glc	12,2	9,1
GlcA	0,0	1,4
GalA	26,8	19,2
<b>Totalt karbohydratinnhold</b>	<b>53,9</b>	<b>63,5%</b>

**Tabell 5.3.5** Tabellen viser prosentvis fordeling av monosakkarider i polysakkaridfraksjonene fra 100-graders ekstraktet i forhold til total mengde sukker. Nederste linje viser prøvenes prosentvise innhold av karbohydrat i forhold til innveid mengde frysetørket prøve. Når det gjelder CgS100N var det ikke nok materiale til å kunne utføre denne testen.

Monosakkarid	CgS100A	CgS100AA
Ara	9,4	12,8
Rha	4,7	3,2
Fuc	0,0	0,0
Xyl	3,0	17,2
Man	0,6	2,1
Gal	48,1	31,5
Glc	4,0	11,1
GlcA	0,0	0,0
GalA	30,3	22,1
<b>Totalt karbohydratinnhold</b>	<b>69,4%</b>	<b>10,7%</b>

#### 5.3.4.2 Bestemmelse av metanol- og eddiksyreinnhold

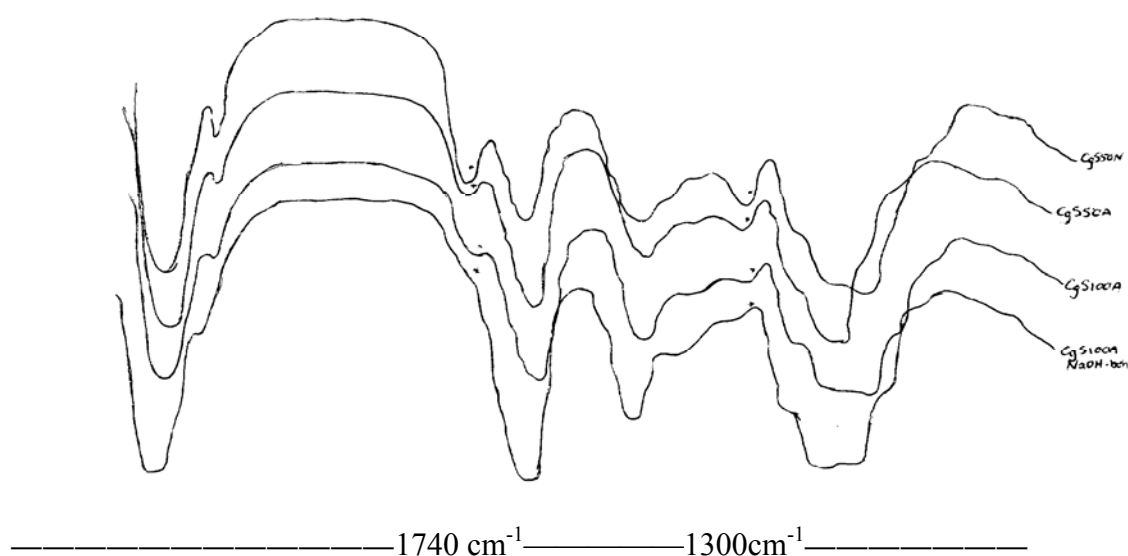
På grunn av det høye innholdet av uronsyrer også i de nøytrale fraksjonene ble det kjørt HPLC omvendt-fase-kolonne med IR-detektor for å bestemme esterifiseringsgrad av metanol (DMe) til syregruppene og eddiksyre (DAc) til OH-gruppene. Resultatet viste en overraskende stor esterifiseringsgrad, noe som kan tyde på interferens og at metoden ikke er egnet til såpass urene stoffer. Vi kan med stor sannsynlighet si at prøvene inneholder metanol og eddiksyre, men det foreligger en stor usikkerhet omkring mengde.

**Tabell 5.3.6** Tabellen viser prosentvis esterifiseringsgrad ut fra prøvenes innhold av metanol og eddiksyre, beregnet i forhold til total sukkermengde, mengde galakturonsyre (Gal A) og total mengde uronsyre (galakturonsyre og glukuronsyre).

Innveid mengde	DMe, % Sukker	DMe, % Gal A	DMe, % uronsyre	DAc, %, sukker	DAc, %, Gal A	DAc, %, uronsyre
(CgS50N) 5,1 mg	30,0	103,0	93,6	29,9	102,7	93,3
(CgS50A) 5,0 mg	40,1	144,8	144,8	14,8	53,4	41,9
(CgS100N) 4,5 mg	3,9	18,4	15,7	3,3	15,3	13,3
(CgS100A) 5,0 mg	14,8	47,6	38,8	7,5	25,7	19,8
CgS100AA 5,1 mg	16,1	57,4	52,0	2,4	8,6	7,7

### 5.3.4.3 IR-spektroskopi

For å undersøke nærmere om prøvene inneholdt naturlig forestrede molekyler, ble det utført IR-spektroskopi på CgS50N, CgS50A og CgS100A. Innhold av estergrupper vil gi et bredt absorpsjonsbånd ved  $1740\text{ cm}^{-1}$ , samt et mindre bånd ved ca  $1300\text{ cm}^{-1}$ . Alle de tre prøvene viste disse toppene, mest markant hos CgS50N. Dette kan forklare det høye innholdet av uronsyrer i en nøytral fraksjon. Etter deesterifisering med NaOH forsvant disse toppene, noe som bekrefter naturlig forestring av syregruppene.



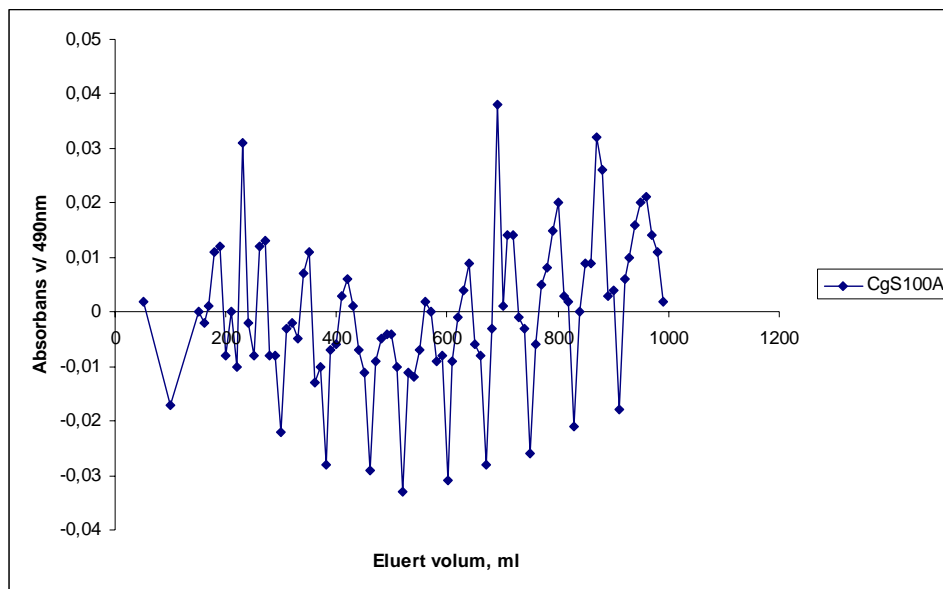
**Figur 5.3.15** IR-spekter av CgS50N, CgS50A og CgS100A. I tillegg er det tatt med en kurve for NaOH-behandlet CgS100A hvor estertoppene ikke er tilstede.

### 5.3.4.4 Enzymdegradering

Fraksjonene CgS50N, CgS50A og CgS100A ble enzymatisk degradert med endopolygalacturonanase (metode 4.4.9) for å isolere de forgrenede områdene ("hairy regions") i pektinene. De nye fraksjonene ble kalt henholdsvis CgS50Nenz, CgS50Aenz og CgS100Aenz. Deretter ble de nye fraksjonene separert på PD-10-kolonne (metode 4.2.4.3), og det ble utført metanolyse og GC (metode 4.3.1.1 – 4.3.1.3), metylering og GC-MS (metode 4.4.1 – 4.4.6), samt komplementfikseringstest (metode 4.6.1) på dem.

## 5.4 SEPARASJON PÅ SEPHACRYL S-400 HR OG ANALYSER PÅ NYE FRAKSJONER

CgS100A ble forsøkt separert på en Sephacryl S-400 HR-kolonne, men resultatet fra fenol-svovelsyretesten (metode 4.3.2) viste at dette ikke var en egnet metode. Årsaken var sannsynligvis svært dårlig løselighet av prøven slik at mengden stoff som ble påsatt kolonnen var for liten til å gi et brukbart resultat. Det ble derfor jobbet videre med og gjort analyser på fraksjonene etter separasjon på ionebytter: CgS50N, CgS50A, CgS100N, CgS100A og CgS100AA.



**Figur 5.4.1:** Ingen tydelig topp tyder på at separasjon på Sephacryl S-400 HR er en lite egnet metode for å separere CgS100A.

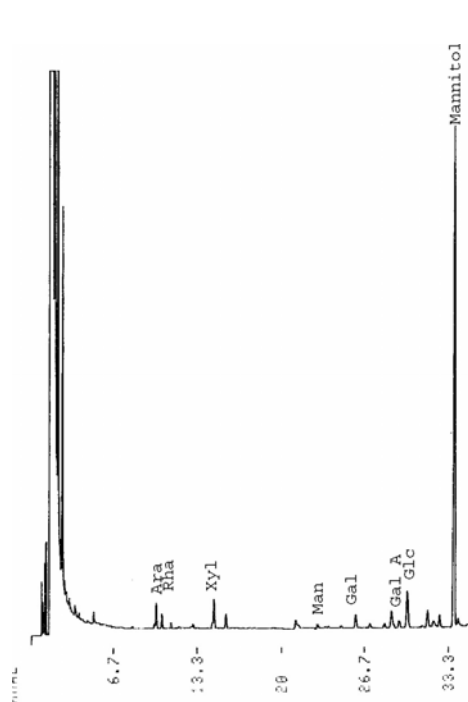
## 5.5 SEPARASJON PÅ PD-10-KOLONNE OG ANALYSER PÅ NYE FRAKSJONER

Etter enzymatisk degradering ble polysakkaridfraksjonene separert etter synkende molekylstørrelse på en PD-10-kolonne. Ved hjelp av fenol-svovelsyretesten (metode 4.3.2) ble noen av fraksjonene slått sammen og analysert med hensyn på monosakkaridinnhold (metode 4.3.1.1-4.3.1.3), komplementfikserende aktivitet (4.6.1) og bindingsforhold (4.4.1-4.4.6)

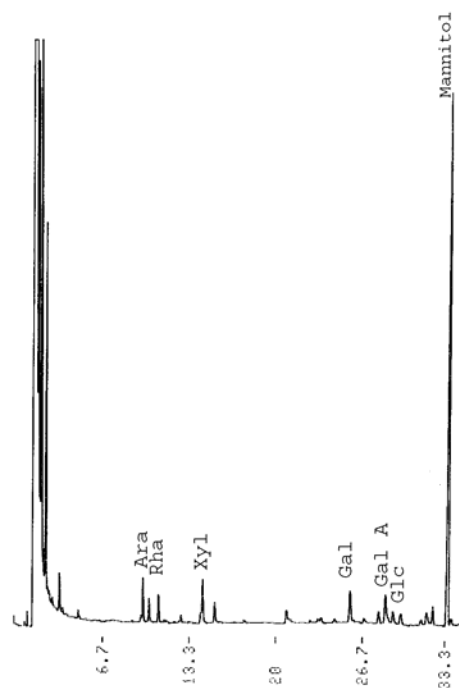
### 5.5.1 Kvantitativ og kvalitativ bestemmelse av monosakkaridinnhold

#### 5.5.1.1 Metanolyse og GC

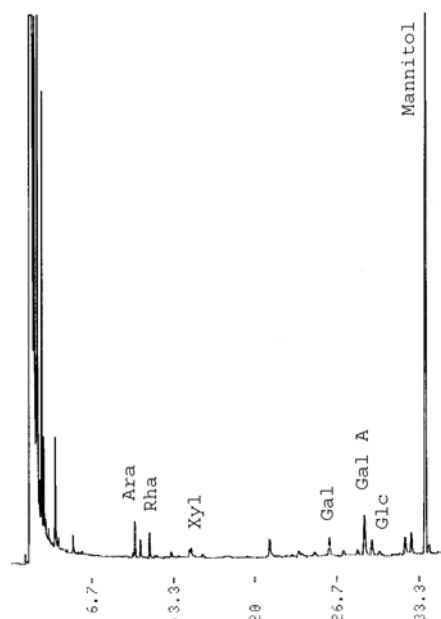
Monosakkaridsammensetningen ble bestemt kvantitativt og kvalitativt ved metanolyse, TMS og gasskromatografi (metode 4.3.1.1-4.3.1.3).



**Figur 5.5.1** Gasskromatografiresultat av monosakkaridbestemmelse for CgS50N



**Figur 5.5.2** Gasskromatografiresultat av monosakkaridbestemmelse for CgS50A



**Figur 5.5.3** Gasskromatografiresultat av monosakkaridbestemmelse for CgS100A

**Tabell 5.5.1** Tabellen viser prosentvis fordeling av monosakkarider i polysakkaridfraksjonene i forhold til total mengde sukker. Nederste linje viser prøvenes prosentvise innhold av karbohydrat i forhold til innveid mengde frysetørket prøve.

Monosakkarid	CgS50Nenz	CgS50Aenz	CgS100enz
Ara	11,9	15,0	2,0
Rha	2,2	7,2	9,7
Fuc	0,0	0,0	0,0
Xyl	17,0	17,3	4,8
Man	0,0	0,0	0,0
Gal	11,8	19,6	17,7
Glc	33,3	7,0	0,0
GlcA	0,0	0,0	0,0
GalA	23,7	33,9	65,8
<b>Totalt karbohydratinnhold</b>	<b>9,2</b>	<b>12,4</b>	<b>6,5</b>

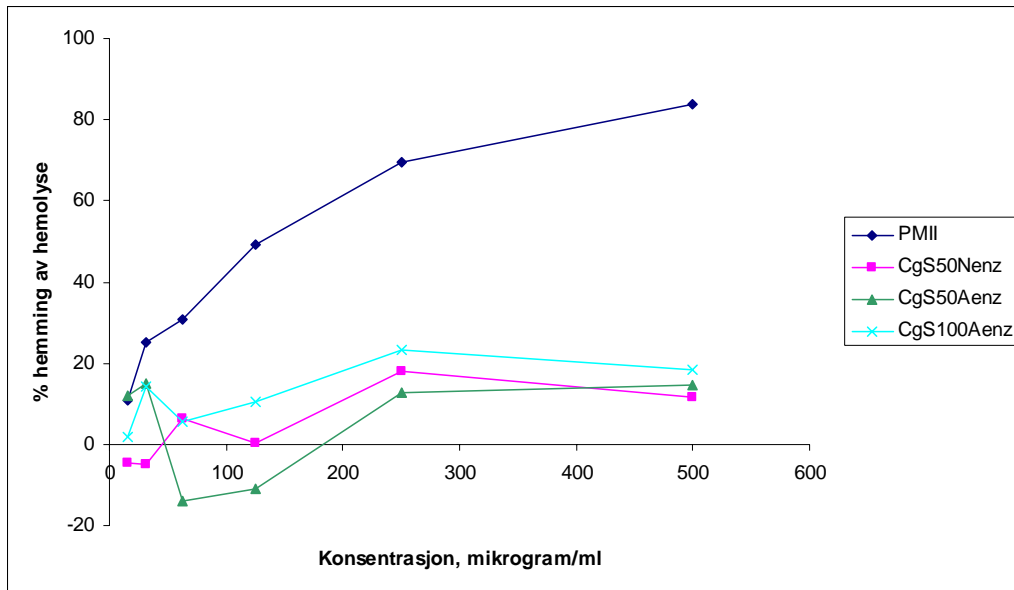
Resultatene fra metylering og GC (tabell 5.5.1) viser svært lavt karbohydratinnhold i alle fraksjoner etter enzymdegradering. Om dette skyldes den enzymatiske behandlingen eller tap av stoff i prøveopparbeidelsen kan ikke sies sikkert, men det er sannsynlig at det har skjedd en reduksjon som følge av enzymdegraderingen og/ eller separasjonen i etterkant siden det samme gjelder for alle fraksjonene og siden mannitoltoppen er høy. Siden toppene er så lave og mange av konformasjontoppene mangler, er det mye usikkerhet rundt identifikasjonen og de oppgitte tallene.

Alle fraksjonen inneholder en god del galakturonsyre, noe som kan tyde på innhold av homogalakturonan. CgS50Nenz inneholder spesielt mye glukose, som sannsynligvis stammer fra stivelse og forurensning, samt xyloglukaner sammen med Xyl, som det også er en del av. Begge 50-graders ekstraktene inneholder ganske mye xylose som også kan komme fra xylaner. Galaktose og arabinose er det også forholdsvis store mengder av i både CgS50A og CgS50N, og sammen kan disse inngå i arabinogalaktaner. I CgS100A er det mye galaktose, men lite arabinose og xylose. Isteden er det noe mer rhamnose i denne fraksjoene enn i de to 50-graders ekstraktene, samt mer galakturonsyre. Disse strukturene kan stamme fra rhamnogalakturonaner. Det er også mye xylose som kan stamme fra xylaner og/ eller xyloglukaner.

### **5.5.2 Biologisk aktivitet**

#### **5.5.2.1 Komplementfikseringstesten**

Komplementfikseringstesten (metode 4.6.1) ble utført på de enzymdegraderte fraksjonene CgS50Nenz, CgS50Aenz og CgS100Aenz for å undersøke biologisk aktivitet i disse fraksjonene, og deretter sammenlikne disse med aktiviteten funnet hos de samme fraksjonene før enzymdegradering. Ved degradering med en pektinase vil de forgrenede områdene ("hairy regions") isoleres, og ved å sammenlikne aktiviteten til fraksjonene før og etter degraderingen kan man få informasjon om aktiviteten til de forgrenede områdene. Figur 5.5.4 viser de ulike fraksjonenes aktivitet på komplementsystemet, sammenliknet med PMII som standard. Høye hemolyseverdier korrelerer til høy komplementfiksierende aktivitet. Alle de tre enzymatisk degraderte fraksjonene viser en langt svakere aktivitet enn de opprinnelige fraksjonene (figur 5.3.10 og figur 5.3.12), og ingen av dem oppnådde 50% hemming av hemolyse, såkalt ICH50-verdi.



**Figur 5.5.4:** Komplementfikserende effekt for CgS50Nenz, CgS50Aenz og CgS100Aenz, sammenliknet med PMII. Alle prøver er løst i veronalbuffer.

Den lave konsentrasjonen av karbohydrat funnet ved metanolyse og GC (tabell 5.5.1) er sannsynligvis årsaken til den lave komplementfikseringsaktiviteten. Alle de viktige monosakkaridene som Ara, Rha, Xyl, Gal og Gal A finnes i alle fraksjonene. Glc mangler i CgS100Aenz slik at det i denne fraksjonen ikke kan ha vært xyloglukaner.

### 5.5.3 Strukturoppklaring

#### 5.5.3.1 Bestemmelse av bindingsforhold i fraksjonene

Bindingsforholdene mellom monosakkaridene i de isolerte polysakkaridene etter enzymdegradering ble bestemt ved hjelp av karboksylsyre-reduksjon og påfølgende metylering (metode 4.4.1-4.4.5) og GC-MS (metode 4.4.6). Tabell 5.5.2 viser det prosentvise innholdet av de ulike monosakkaridene etter bindingstype. Tallene er fremkommet etter bearbeidelse av kromatogrammene, samt bruk av prosentvis totalinnhold av de ulike monosakkaridene funnet ved metanolyse, TMS-derivatisering og GC (metode 4.3.1.1-4.3.1.3) (tabell 5.5.1) for de aktuelle prøvene. Noen av toppene i kromatogrammet overlapper hverandre slik at mengde beregnet ut fra areal ikke er helt korrekt. Det mye usikkerhet rundt de beregnede mengdene, grunnet veldig lavt karbohydratinnhold og dermed små topper.

**Tabell 5.5.2:** Tabellen viser prosentvis innhold av de ulike monosakkaridene basert på bindingsforhold, beregnet ut fra arealer i GC-MS-kromatogram og GC-kromatogram.



Monosakkarider og deres bindingstype	CgS50Nenz	CgS50Aenz	CgS100Aenz
<b>T Araf</b>	1,6*	13,1	Spor
<b>1,3 Araf</b>		0,8	
<b>1,5 Araf</b>	10,3	1,1	Spor
<b>T Xyl</b>	17	17,3*	Spor
<b>T Rha</b>		6,2*	
<b>1,2 Rha</b>		1,0	Spor
<b>T Gal</b>	5,6	1,4*	
<b>1,6 Gal</b>		1,3	
<b>1,3 Gal</b>		5,8	Spor
<b>1,4 Gal</b>	6,2*	1,6*	
<b>1,3,6 Gal</b>		6,3	
<b>1,3,4,6 Gal</b>		3,2	
<b>T Glc</b>	20,1	0,5*	
<b>1,4 Glc</b>	13,1	6,5	Spor
<b>T GalA</b>		5,6*	
<b>1,4 GalA</b>	23,7*	28,3*	
<b>1,3,4 GalA</b>		Spor	
<b>T GlcA</b>		Spor*	Spor
<b>Totalt</b>	97,6	100	

\* Stoffer som deler topp med et annet stoff, mengde beregnet ut fra mengder av viktige molekyllioner i kromatogrammet.

I den videre diskusjonen ses det på mulighetene for tilstedeværelse av de viktigste strukturelle plantepolysakkaridene; homogalakturenan, rhamnogalakturenan I og II, xylaner, arabinogalakatan I og II, xyloglukaner og stivelse. Flere av disse har vist å ha biologisk aktivitet (3.2.2).

### **CgS50Nenz**

#### *Homogalakturenan*

Fraksjonen inneholder 1,4 Gal A (6,2%), noe som tyder på innhold av lineære homogalakturenankjeder. 1,3,4 Gal A er ikke observert, noe som kan tyde på lav forgreningsgrad.

*Rhamnogalakturonan I (RG I)*

Rhamnose er ikke funnet i denne fraksjonen i det hele tatt, og det er derfor lite sannsynlig at RG I er tilstede.

*Rhamnogalakturonan II (RG II)*

RG II består i tillegg til 1,2 Rha, 1,4 Gal A og 1,3,4 Gal A av T Rha og T Ara (4,5%). Med unntak av 1,4 Gal A finnes ingen av disse i denne fraksjonen. RG II er derfor sannsynligvis ikke tilstede.

*Stivelse/forurensning*

Innhold av 1,4 Glc (13,1%) og T Glc (20,2%) kan tyde på innhold av stivelse og/ eller mindre forurensning fra cellulose.

*Xylaner*

Denne strukturen finnes det sannsynligvis ikke mye i CgS50Nenz. Verken 1,4 Xyl eller 1,2,4 Xyl er observert.

*Arabinogalaktan I (AG I)*

T Gal (5,6%) og 1,4 Gal (6,2%) er tilstede, men 1,3,4 Gal og 1,3,5 Ara er ikke funnet. T Ara (1,6%) og 1,5 Ara (10,3%) er det imidlertid noe av, men disse molekylene kan stamme fra andre strukturer.

*Arabinogalaktan II (AG II)*

CgS50Nenz inneholder verken 1,3 Gal eller 1,3,6 Gal, noe som tyder på at fraksjonen ikke inneholder AG II.

*Xyloglukaner*

Innholdet av xylose, i form av T Xyl (17%), er høyt, og tyder sammen med 1,4 Glc på innhold av xyloglukaner.

***Oppsummering CgS50Nenz***

Ut fra de bindingstyper som er observert i kromatogrammet ser det ut til at CgS50Nenz hovedsakelig inneholder homogalakturonankjeder med lite forgreninger, xyloglukaner, stivelse eller forurensning samt muligens arabinogalaktan I.

**CgS50Aenz**

*Homogalakturonan*

Fraksjonen inneholder mye 1,4 Gal A (28,3%), noe som tyder på innhold av lineære homogalakturonankjeder. 1,3,4 Gal A er kun observert i spormengder, noe som kan tyde på lav forgreningsgrad.

*Rhamnogalakturonan I (RG I)*

Rhamnose foreligger som 1,2 Rha (1,0%) og T Rha (6,2%). RG I, som består av 1,4 Gal A, 1,3,4 Gal A og 1,2 Rha, kan derfor være tilstede i små mengder selv om 1,2,4 Rha ikke er funnet.

*Rhamnogalakturonan II (RG II)*

Rhamnogalakturonan type II består i tillegg til 1,2 Rha, 1,4 Gal A og 1,3,4 Gal A av T Rha og T Ara (4,5%). Alle disse finnes i denne fraksjonen, og det er derfor sannsynlig at RG II er tilstede.

*Stivelse/foreurensning*

Innhold av 1,4 Glc (6,5%) og T Glc (0,5%) kan tyde på innhold av stivelse og/ eller mindre foreurensning fra cellulose.

*Xylaner*

Denne strukturen finnes det sannsynligvis ikke mye i CgS50Aenz. Verken 1,4 Xyl eller 1,2,4 Xyl er observert.

*Arabinogalaktan I (AG I)*

T Gal (1,4%) og 1,4 Gal (1,6%) er tilstede, men ikke 1,3,4 Gal. 1,3,5 Ara (spor), T Ara (13,1%) og 1,5 Ara (1,1%) er det imidlertid noe av, men disse molekylene kan stamme fra andre strukturer.

*Arabinogalaktan II (AG II)*

CgS50Aenz inneholder 1,3 Gal, men ikke 1,3,6 Gal, noe som tyder på at fraksjonen ikke inneholder AG II.

### *Xyloglukaner*

Innholdet av xylose, i form av T Xyl (17,3%), er høyt, og tyder sammen med 1,4 Glc på innhold av xyloglukaner.

### ***Oppsummering CgS50Aenz***

Ut fra de bindingstyper som er observert i kromatogrammet ser det ut til at CgS50Aenz hovedsakelig inneholder homogalakturonankjeder med lite forgreninger, xyloglukaner, stivelse eller forurensning samt muligens rhamnogalakturonan I og II og arabinogalaktan II.

### ***CgS100Aenz***

Denne fraksjonen inneholder på grunn av stofftap under prøveopparbeidelsen veldig lite karbohydrat. Det er derfor ikke mulig å si noe sikkert om hva den inneholder. Følgende tolkning er gjort ut fra de oppnådde metyleringsresultatene.

### *Homogalakturonan*

Fraksjonen inneholder verken 1,4 Gal A eller 1,3,4 Gal A, noe som tyder på at den ikke inneholder lineære homogalakturonankjeder med forgreninger i 3-posisjon.

### *Rhamnogalakturonan I (RG I)*

Rhamnose foreligger som spormengder av 1,2 Rha, men siden verken 1,4 Gal A eller 1,3,4 Gal A er funnet er det ikke sannsynlig at RG I er tilstede.

### *Rhamnogalakturonan II (RG II)*

RG II består i tillegg til 1,2 Rha, 1,4 Gal A og 1,3,4 Gal A av T Rha og T Ara. Siden det av disse kun er spormengder av 1,2 Rha og T Ara tilstede, er det sannsynligvis ikke RG II i fraksjonen.

### *Stivelse/forurensning*

Innhold 1,4 Glc og T Glc kan tyde på innhold av stivelse og/ eller mindre forurensning fra cellulose.

### *Xylaner*

Denne strukturen finnes det sannsynligvis ikke mye i CgS50Aenz. Verken 1,4 Xyl eller 1,2,4 Xyl er observert.

*Arabinogalaktan I (AG I)*

Siden verken T Gal, 1,4 Gal, 1,3,4 Gal eller 1,3,5 Ara er tilstede inneholder ikke denne fraksjonen AG I. T Ara og 1,5 Ara er det imidlertid noe av, men disse molekylene kan stamme fra andre strukturer.

*Arabinogalaktan II (AG II)*

CgS100Aenz inneholder 1,3 Gal, men ikke 1,3,6 Gal, noe som tyder på at fraksjonen ikke inneholder AG II. AG II kan likevel ha vært tilstede i så små mengder at 1,3,6 Gal ikke var detekterbar.

*Xyloglukaner*

Innholdet av xylose i form av T Xyl tyder sammen med 1,4 Glc på innhold av xyloglukaner.

***Oppsummering CgS100Aenz***

Ut fra de bindingstyper som er observert i kromatogrammet ser det ut til at CgS100Aenz hovedsakelig inneholder xyloglukaner, stivelse eller forurensning samt muligens arabinogalakturonan II. Det må imidlertid tas i betraktning den spesielt store usikkerheten som gjelder denne prøven.

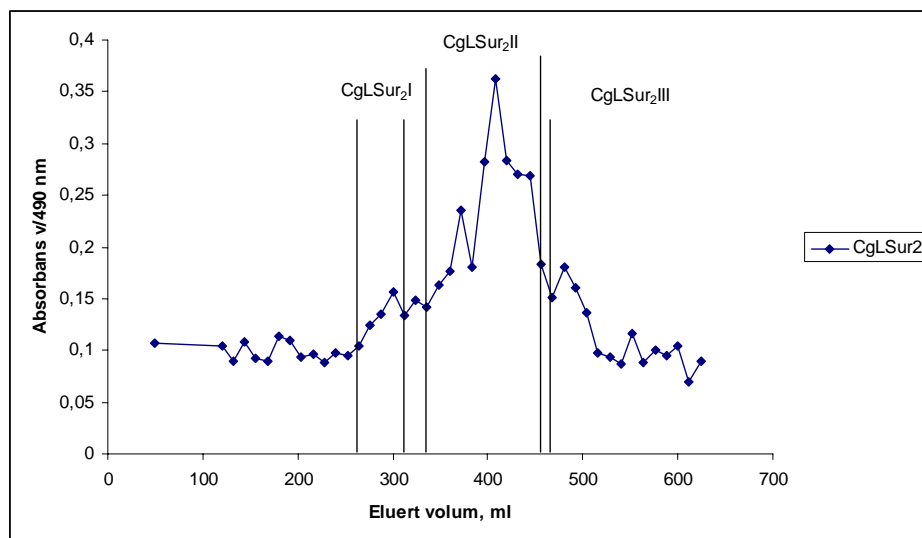
## 6 RESULTAT OG DISKUSJON, STORE BLADER

Når det gjelder de store bladene ble det arbeidet videre med materiale preparert av Anne Marthe Ringerud (2003). Fraksjonen heter i hennes oppgave Sur2, mens den i denne oppgaven kalles CgLSur<sub>2</sub>.

### 6.1 Separasjon på Sephacryl S-400 HR og analyser utført på nye fraksjoner

CgLSur<sub>2</sub> ble applisert på en Sephacryl S-400 HR-kolonne for å separere molekylene etter synkende størrelse.

0,117 g prøvemateriale ble løst i 40 ml destillert vann og påsatt kolonnen i 4 omganger, 10 ml hver gang. Det ble eluert med 10 mM NaCl, og eluatet ble samlet opp i fraksjoner på ca 6 ml. Fenol-svovelsyretesten (metode 4.3.2) ble utført, og på bakgrunn av resultatet ble fraksjonene samlet i 3 større fraksjoner kalt CgLSur<sub>2</sub>I, CgLSur<sub>2</sub>II og CgLSur<sub>2</sub>III (figur 6.1.1). Disse ble dampet inn og frysetørket, og det ble deretter gjort en del analyser på stoffene.

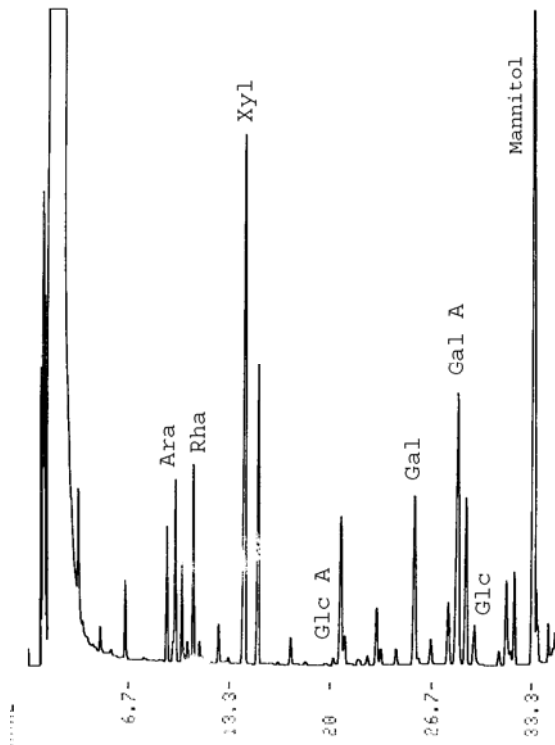


**Figur 6.1.1** Karbohydratprofil etter fenol-svovelsyretest på CgLSur<sub>2</sub>II

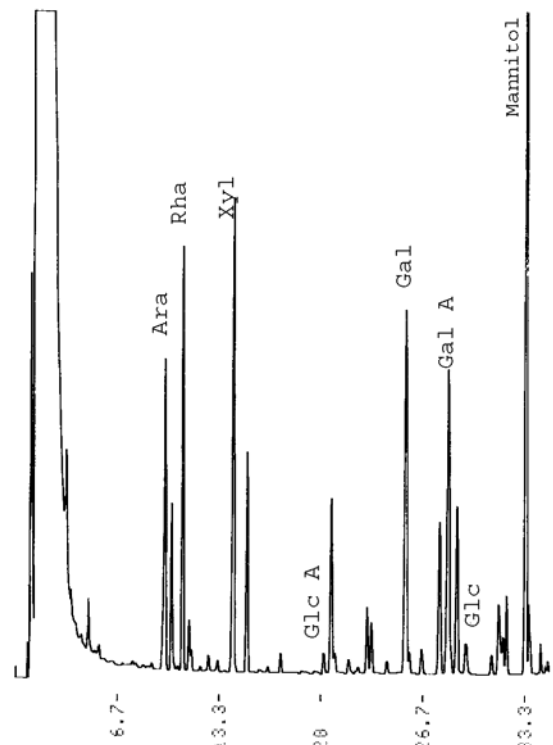
## 6.1.1 Kvantitativ og kvalitativ bestemmelse av monosakkaridinnhold

### 6.1.1.1 Metanolyse og GC

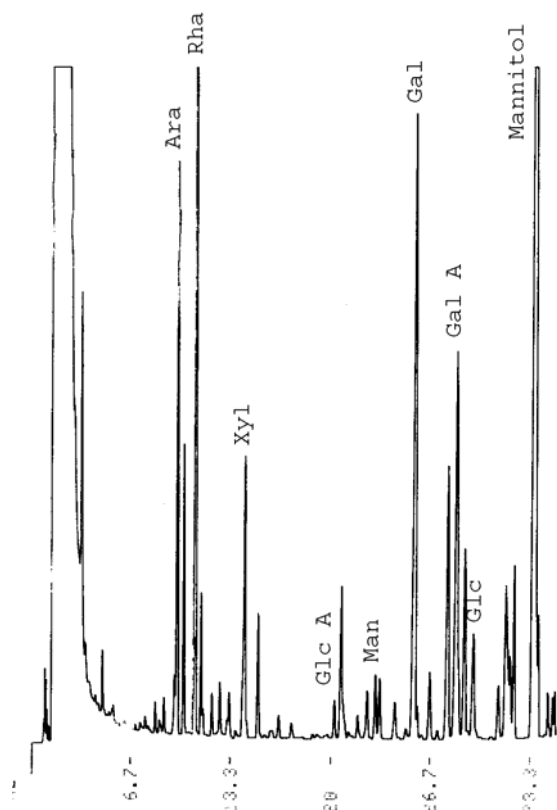
Monosakkaridsammensetningen ble deretter bestemt kvantitativt og kvalitativt ved metanolyse, TMS og gasskromatografi (metode 4.3.1.1-4.3.1.3).



**Figur 6.1.2** Gasskromatografiresultat av monosakkaridbestemmelse for CgLSur<sub>2</sub>I



**Figur 6.1.3** Gasskromatografiresultat av monosakkaridbestemmelse for CgLSur<sub>2</sub>II



**Figur 5.1.4** Gasskromatografiresultat av monosakkaridbestemmelse for CgLSur<sub>2</sub>III

**Tabell 6.1.1:** Tabellen viser prosentvis fordeling av monosakkarider i polysakkaridfraksjonene i forhold til total mengde sukker. Nederste linje viser prøvenes prosentvise innhold av karbohydrat i forhold til innveid mengde frysetørket prøve.

Monosakkarid	CgLSur <sub>2</sub> I	CgLSur <sub>2</sub> II	CgLSur <sub>2</sub> III
Ara	10,4	12,4	11,9
Rha	7,6	9,9	17,0
Fuc	0	0	0
Xyl	42,3	17,7	8,5
Man	0	0	2,0
Gal	17,2	19,4	26,1
Glc	4,6	2,2	4,8
GlcA	5,3	7,0	8,8
GalA	12,6	31,2	20,8
<b>Totalt karbohydratinnhold</b>	<b>35,8</b>	<b>67,2</b>	<b>54,8</b>

Alle fraksjonene inneholder en god del galakturonsyre, noe som kan tyde på innhold av pektinkjeder. CgLSur<sub>2</sub>I inneholder spesielt mye xylose, noe som kan stamme fra xylaner og/eller xyloglukaner. Rhamnose og galakturonsyre indikerer innhold av rhamnogalakturonaner. I CgLSur<sub>2</sub>II og CgLSur<sub>2</sub>III er det ganske mye galakturonsyre, mest i CgLSur<sub>2</sub>II. Alle



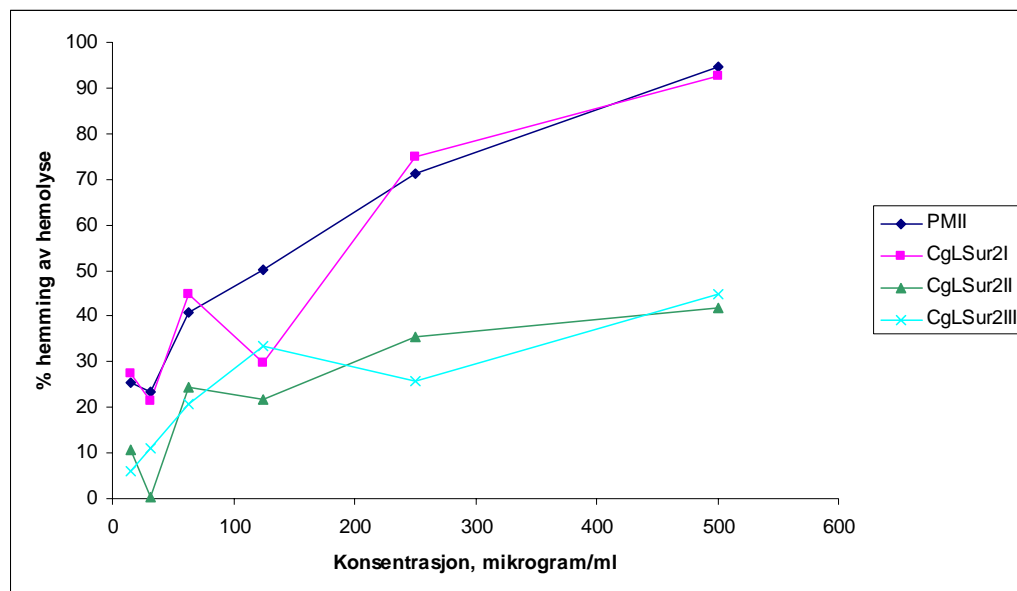
fraksjonene inneholder også store mengder galaktose og arabinose som kan inngå i arabinogalaktaner.

## 6.1.2 Biologisk aktivitet

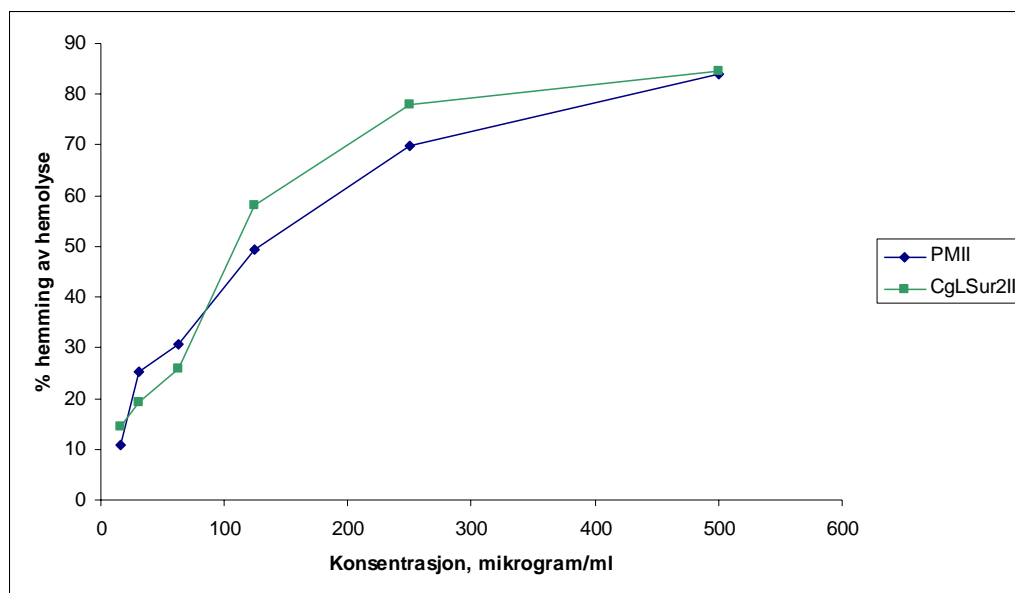
### 6.1.2.1 Komplementfikseringstesten

Komplementfikseringstesten (metode 4.6.1) ble utført på fraksjonene CgLSur<sub>2</sub>I, CgLSur<sub>2</sub>II og CgLSur<sub>2</sub>III for å undersøke biologisk aktivitet. Figur 6.1.5 viser de ulike fraksjonenes aktivitet på komplementsystemet, sammenliknet med PMII som standard. Høye hemolyseverdier korrelerer til høy komplementfikserende aktivitet. CgLSur<sub>2</sub>II og CgLSur<sub>2</sub>III viste en aktivitet langt lavere enn de andre fraksjonene, noe som sannsynligvis skyldes en lavere stoffkonsentrasjon enn 1 mg/ml. På grunn av manglende merking av korker på supelcorørene som stoffene var veid inn i, ble det tapt en del stoff fra to av prøvene. Noe stoff satt fast i korkene, og måtte kastes da det var ukjent hvilken fraksjon korkene tilhørte. CgLSur<sub>2</sub>I viste omtrent samme aktivitet som standarden PMII.

Det var kun fraksjon CgLSur<sub>2</sub>II det var nok stoff av til å utføre testen en gang til. Resultatet fra denne testen er gitt i figur 6.1.6.



**Figur 6.1.5** Komplementfikserende aktivitet for CgLSur<sub>2</sub>I, CgLSur<sub>2</sub>II og CgLSur<sub>2</sub>III, sammenliknet med PMII. Alle prøver er løst i veronalbuffer.



**Figur 6.1.6** Komplementfikserende aktivitet for CgLSur<sub>2</sub>II, sammenliknet med PMII. Begge prøver er løst i veronalbuffer.

Ved annengangs utføring av testen på CgLSur<sub>2</sub>II viser denne fraksjonen like bra aktivitet som PMII. Ut fra de to grafene er det sannsynlig at konsentrasjonen til CgLSur<sub>2</sub>I ved førstegangs utførelse av testen var 1 mg/ml, mens den for CgLSur<sub>2</sub>II og CgLSur<sub>2</sub>III var for lav. Men dette kan man ikke si med sikkerhet. CgLSur<sub>2</sub>II og CgLSur<sub>2</sub>III nådde aldri 50% hemming av hemolyse i det første forsøket, og det kan derfor ikke sies noe om deres ICH<sub>50</sub>-verdi. For CgLSur<sub>2</sub>I var ICH<sub>50</sub>-verdien den samme som for PMII (antatt at nedgangen ved punkt 4 skyldes en feil), nemlig ca 125 mikrogram/ml. I det andre forsøket med CgLSur<sub>2</sub>II viste også denne en IC<sub>50</sub>H-verdi på ca 125 mikrogram/ml.

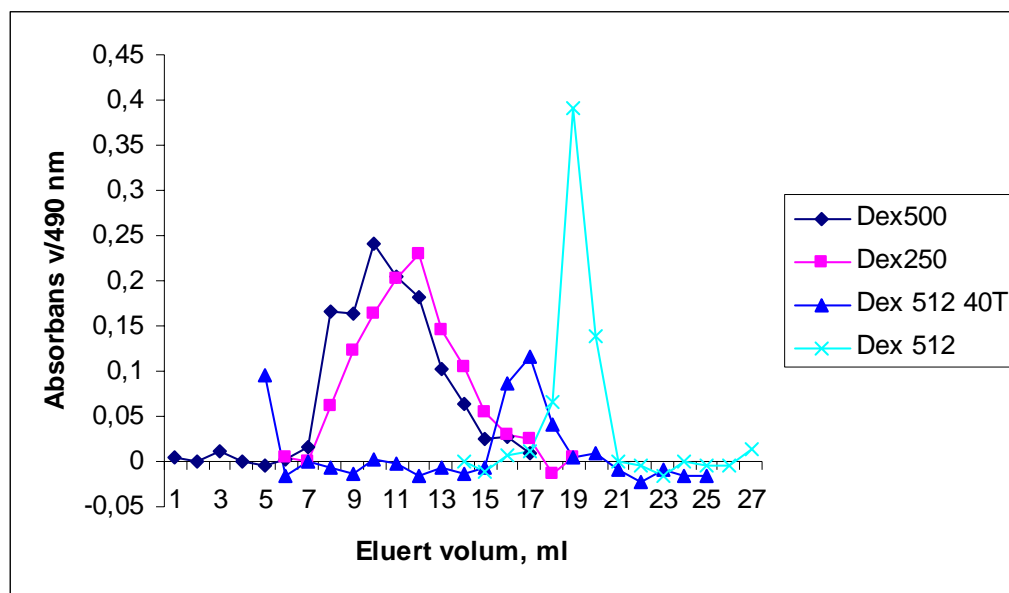
Resultatet fra metanolyse og GC (tabell 6.1.1) tyder på innhold av pektiner av typene rhamnogalakturonaner og homogalakturonan, samt arabinogalaktaner, strukturer som tidligere er vist å ha komplementfiserende aktivitet (Yamada og Kiyohara 1999), og som kan være ansvarlig for den observerte aktiviteten i de tre prøvene.

### 6.1.3 Bestemmelse av molekylvekt, FPLC

Fraksjonene CgLSur<sub>2</sub>I og CgLSur<sub>2</sub>II ble separert analytisk etter synkende molekylvekt. Fenol-svovelsyretesten (metode 4.3.2) ble benyttet for å finne ut ved hvilke volum polysakkaridene ble eluert ut (start, toppunkt og slutt), og deretter ble disse verdiene plottet mot en

semilogaritmisk standardkurve laget av dekstraner med kjent molekylvekt (figur 6.1.8).

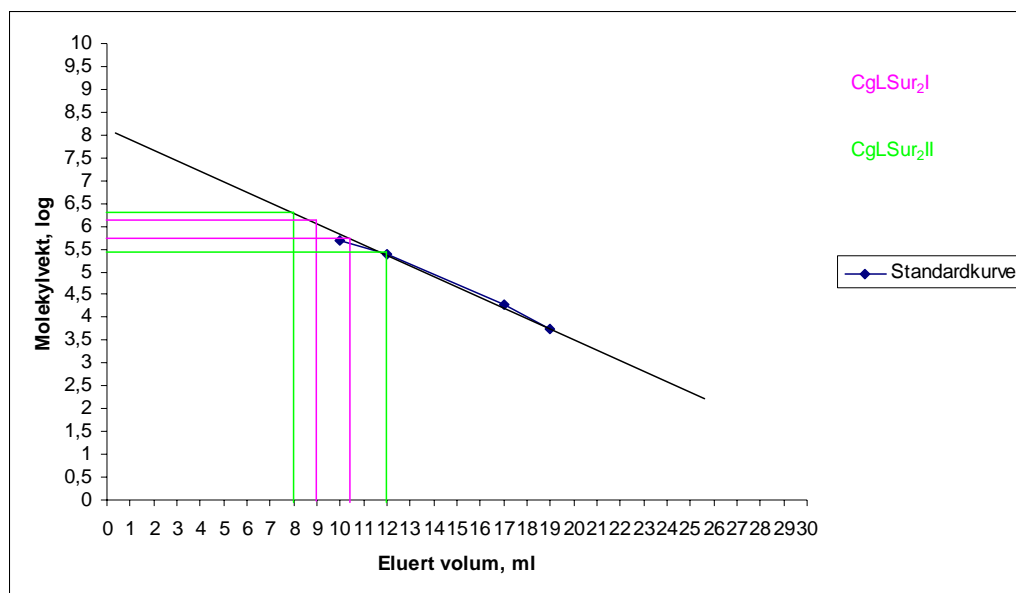
Resultatet fremkommer i figur 6.1.8 og tabell 6.1.2.



**Figur 6.1.7** Grafene viser hvordan de fire dekstranstandardene ble eluert ut.

Toppunktene, som illustrerer hvor hovedtyngden av karbohydratene ble eluert ut, ble benyttet til å lage en standardkurve. Mellom ca 10 og 20 ml er kurven lineær, men områdene på utsidene kan man ikke si noe om. Molekylvekten til molekyler i prøvene som kommer ut utenfor dette området kan man ikke si noe mer om enn at de er større enn molekylene fra den mest høymolekylære standarden, i dette tilfellet 475 kDa, eller mindre enn molekylene i den mest lavmolekylære standarden.

De inntegnede strekene viser ved hvilke ml karbohydratene ble eluert ut, toppunkt og sluttspunkt, fra grafene etter fenol-svovelsyretesten. Startpunkter er ikke tegnet inn da disse kom før i voidvolumet.



**Figur 6.1.8** Molekylvekten i de ulike fraksjonene ble beregnet ut fra en standardkurve laget etter kjøring av dekstraner med kjent molekylvekt.

**Tabell 6.1.2 :** Molekylvekter for de ulike fraksjonene, omregnet fra logaritmiske tall avlest på graf i figur 5.3.13.

Fraksjon	Laveste Mw, Da	Høyeste Mw, Da	Hovedtyngde, Da
CgLSur <sub>2</sub> I	≥ 475 000	≥ 475 000	≥ 475 000
CgLSur <sub>2</sub> II	300 000	≥ 475 000	≥ 475 000

Begge fraksjonene er høymolekylære, og inneholder molekyler som kommer ut før den største standarden. Med det utstyret som ble benyttet er det ikke mulig å si noe mer enn at molekylvekten er høyere eller lik molekylvekten til den mest høymolekylære standarden, 475 kDa.

## 6.1.4 Strukturoppklaring

### 6.1.4.1 Bestemmelse av bindingsforhold i fraksjonene

Bindingsforholdene mellom monosakkaridene i de isolerte polysakkaridene etter separasjon på DEAE-ionebytter ble bestemt ved hjelp av karboksylsyre-reduksjon og påfølgende metylering (metode 4.4.1-4.4.5) og GC-MS (metode 4.4.6). Tabell 6.1.3 viser det prosentvise innholdet av de ulike monosakkaridene etter bindingstype. Tallene er fremkommet etter bearbeidelse av GC-MS-kromatogrammene, samt bruk av prosentvis totalinnhold av de ulike monosakkaridene funnet ved metanolyse, TMS-derivatisering og GC (metode 4.3.1.1-4.3.1.3) (tabell 6.1.1) for de aktuelle prøvene. Noen av toppene i kromatogrammet overlapper hverandre slik at mengde beregnet ut fra areal ikke er helt korrekt.

**Tabell 6.1.3** Tabellen viser prosentvis innhold av de ulike monosakkaridene basert på bindingsforhold, beregnet ut fra arealer i GC-MS-kromatogram og GC-kromatogram.

Monosakkarider og deres bindingstype	CgLSur <sub>2</sub> I	CgLSur <sub>2</sub> II	CgLSur <sub>2</sub> III
<b>T Araf</b>	8,2	8,9	9,5
<b>1,3 Araf</b>	0,6	0,7	0,8
<b>1,5 Araf</b>	1,6	2,1	1,6
<b>1,2,4 Ara</b>	-	Spor	-
<b>1,2,5 Araf</b>	Muligens*	Muligens*	Muligens spor*
<b>1,3,5 Araf</b>	Muligens*	0,7	Muligens spor*
<b>T Xylp</b>	41	11,3	2,2
<b>1,4 Xylp</b>	1,0	6,4	6,3
<b>1,3 Xyl</b>	0,3	-	-
<b>1,2,4 Xyl</b>	Muligens*	Muligens spor*	Muligens spor*
<b>1,3,4 Xyl</b>	Muligens*	-	Muligens spor
<b>T Rha</b>	6,5	5,4	13,7
<b>1,2 Rha</b>	Spor	Spor	Spor
<b>1,3 Rha</b>	-	0,3	0,7
<b>1,2,4 Rha</b>	1,1	4,2	2,6
<b>T Fuc</b>	Spor	Spor	Spor
<b>T Gal</b>	3,9**	4,9**	6,9**
<b>1,6 Gal</b>	1,5	1,4	4,3
<b>1,3 Gal</b>	3,5	3,4	4,4
<b>1,4 Gal</b>	Spor**	-	Spor**
<b>1,3,6 Gal</b>	5,4	6,6	8,4
<b>1,3,4,6 Gal</b>	2,8	3,1	2,1
<b>T Glc</b>	-	-	0,5**
<b>1,4 Glc</b>	4,6**	2,2**	4,3**
<b>T GalA</b>	0,2**	0,7**	2,0**
<b>1,4GalA</b>	7,8**	24,0**	16,8**
<b>1,3,4 GalA</b>	4,6	6,5	2,0
<b>T GlcA</b>	3,4	3,9	4,9**
<b>1,4 GlcA</b>	1,9**	3,1**	3,9**
<b>1,3' apiose</b>	Muligens spor	Muligens spor	Muligens spor
<b>Totalt</b>	99,9	99,8	97,9

\* Noen stoffer kommer tett, evt inni hverandre, og har liknende spektre. Det kan derfor være vanskelig å identifisere alle topper. Dette gjelder spesielt 1,2,5 Ara og 1,2,4 Xyl, samt 1,3,5 og 1,3,4 Xyl.

\*\* Stoffer som deler topp med et annet stoff, mengde beregnet ut fra mengder av viktige molekyllioner i kromatogrammet.

I den videre diskusjonen ses det på mulighetene for tilstedeværelse av de viktigste strukturelle plantepolysakkaridene; homogalakturonan, rhamnogalakturonan I og II, xylaner, arabinogalaktan I og II, xyloglukaner og stivelse. Flere av disse har vist å ha biologisk aktivitet (3.2.2). Alle fraksjonene inneholder muligens 1,3' apiose, et sjeldent monosakkarid som inngår i de forgrenede områdene ("hairy regions") i rhamnogalakturonaner.

### **Bindingsforhold CgLSur<sub>2</sub>I**

#### *Homogalakturonan*

Fraksjonen med størst molekylvekt inneholder ikke så mye 1,4 Gal A (7,8%), men det som er kan stamme fra lineære områder bestående av homogalakturonan. Fraksjonen inneholder også noe T Gal A (0,2%), samt 1,3,4 Gal A (4,6%). Førstnevnte kan blant annet stamme fra endepunkter på galakturonankjeder, og sistnevnte viser at galakturonankjeden har noen forgreninger i 3-posisjon.

#### *Rhamnogalakturonan I (RG I)*

Fraksjonen inneholder lite rhamnose, men det lille som er av 1,2 Rha (spor) og 1,2,4 Rha (1,1%) tyder, sammen med 1,4 Gal A og 1,3,4 Gal A, på innhold av RG I. Dette er alternerende kjeder av Rha og Gal A med forgreninger i 4-posisjon på rhamnose og 3-posisjon på galakturonsyre.

#### *Rhamnogalakturonan II (RG II)*

1,4 Gal A og 1,3,4 Gal A kan også stamme fra RG II med forgreninger i 3-posisjon på noen av enhetene. På disse kjedene kan vi ha T Ara, T Rha og 1,2 Rha. I denne fraksjonen finnes monosakkarider med disse bindingstypene i henholdsvis 8,2%, 6,5% og spor.

#### *Stivelse / forurensning*

Innhold av 1,4 Glc (4,6%) tyder på innhold av stivelse, men kan også stamme fra celluloseforurensning.

### *Xylaner*

Fraksjonen inneholder noe 1,4 Xyl (1%), og dette kan stamme fra xylaner. 1,2,4 Xyl er muligens tilstede, men er vanskelig å identifisere sikkert. Til disse er det eventuelt bundet T Ara i 2-posisjon. Noe av T Xyl kan være endemolekyler i en slik struktur.

### *Arabinogalaktan I (AG I)*

Om det i det hele tatt er noe av denne strukturen er det i så fall ikke mye. Det er lite T Gal (3,9%), kun spor av 1,4 Gal, ikke noe 1,3,4 Gal. T Ara og 1,5 Ara er det imidlertid noe mer av, og 1,3,5 Ara er muligens til stede. Men disse molekylene kan stamme fra andre strukturer.

### *Arabinogalaktan II (AG II)*

Gal foreligger mest i bindingsforhold 1,3,6 Gal (5,4%). Sammen med 1,3 Gal (3,5%) kan dette stamme fra AG II, med kjeder av bundet 1,3 Gal med forgreninger 6-posisjon til T Gal, T Ara eller 1,3 Ara.

### *Xyloglukaner*

Innhold av store mengder T Xyl (41%) kan, sammen med 1,4 Glc, tyde på at fraksjonen inneholder xyloglukaner med hovedkjede av 1,4 Glc med T Xyl bundet i 6-posisjon på noen av glukosemolekylene. Spormengder av T Fuc stammer sannsynligvis fra denne strukturen, og kanskje finnes noe 1,2 Xyl og 1,2 Gal selv om det ikke er funnet i kromatogrammet.

### ***Oppsummering CgLSur<sub>2</sub>I***

Ut fra de bindingstyper som er observert i kromatogrammet ser det ut til at CgLSur<sub>2</sub>I inneholder hovedsakelig homogalakturonan, arabinogalaktan II og xyloglukaner, samt muligens rhamnogalakturonan II.

### **Bindingsforhold CgLSur<sub>2</sub>II**

#### *Homogalakturonan*

Den midterste fraksjonen med hensyn på molekylvekt inneholder mye 1,4 Gal A (24%), og mye av dette stamme sannsynligvis fra lineære områder bestående av homogalakturonan. Fraksjonen inneholder også noe 1,3,4 Gal A (6,5%), noe som viser at galakturonankjeden har noen forgreninger i 3-posisjon.

#### *Rhamnogalakturonan I (RG I)*

Fraksjonen inneholder lite rhamnose. 1,2 Rha er tilstede kun i spormengder, men 1,2,4 Rha er det 4,2% av. Tilstedeværelse av 1,2 Rha, sammen med 1,2,4 Rha, 1,4 Gal A og 1,3,4 Gal A, kan tyde på innhold av RG I. Dette er alternerende kjeder av Rha og Gal A med forgreninger i 4-posisjon på rhamnose og 3-posisjon på galakturonsyre.

#### *Rhamnogalakturonan II (RG II)*

1,4 Gal A og 1,3,4 Gal A kan også stamme fra RG II med forgreninger i 3-posisjon på noen av enhetene. På disse kjedene kan vi ha T Ara, T Rha og 1,2 Rha. I denne fraksjonen finnes monosakkarider med disse bindingstypene i henholdsvis 8,9%, 5,4% og spormengder.

#### *Stivelse /forurensning*

Innhold av 1,4 Glc (2,2%) tyder på innhold av stivelse, men kan også stamme fra celluloseforurensning.

#### *Xylaner*

Fraksjonen inneholder en del 1,4 Xyl (6,4%), og dette kan stamme fra xylaner. 1,2,4 Xyl er vanskelig å identifisere i kromatogrammet, men finnes muligens, og til disse kan det eventuelt være bundet T Ara i 2-posisjon. Noe av T Xyl kan være endemolekyler i en slik struktur.

#### *Arabinogalaktan I (AG I)*

Om det i det hele tatt er noe av denne strukturen er det i så fall ikke mye. Det er noe T Gal (4,9%), men verken synlige mengder av 1,4 Gal eller 1,3,4 Gal. T Ara, 1,5 Ara og 1,3,5 Ara er det imidlertid varierende mengder av. Men disse molekylene kan stamme fra andre strukturer.

#### *Arabinogalaktan II (AG II)*

Gal foreligger mest i bindingsforhold 1,3,6 Gal (6,6%). Sammen med 1,3 Gal (3,4%) kan dette stamme fra AG II, med kjeder av bundet 1,3 Gal med forgreninger 6-posisjon til T Gal, T Ara eller 1,3 Ara.

#### *Xyloglukaner*

Innhold av store mengder T Xyl (11,3%) kan, sammen med 1,4 Glc, tyde på at fraksjonen inneholder xyloglukaner med hovedkjede av 1,4 Glc med T Xyl bundet i 6-posisjon på noen



glukosemolekyler. Spormengder av T Fuc stammer sannsynligvis fra denne strukturen, og kanskje finnes noe 1,2 Xyl og 1,2 Gal selv om det ikke er funnet i kromatogrammet.

### ***Oppsummering CgLSur<sub>2</sub>II***

Ut fra de bindingstyper som er observert i kromatogrammet ser det ut til at CgLSur<sub>2</sub>II inneholder hovedsakelig homogalakturonan, rhamnogalakturonan I, arabinogalaktan II, xylaner og xyloglukaner, samt muligens rhamnogalakturonan II.

### **Bindingsforhold CgLSur<sub>2</sub>III**

#### ***Homogalakturonan***

Fraksjonen med lavest molekylvekt inneholder ganske mye 1,4 Gal A (16,8%), og kan stamme fra lineære områder bestående av homogalakturonan. Fraksjonen inneholder også noe T Gal A (2,0%), samt 1,3,4 Gal A (2,0%). Førstnevnte kan blant annet stamme fra endepunkter på galakturonankjeder, og sistnevnte viser at galakturonankjedene har noen forgreninger i 3-posisjon.

#### ***Rhamnogalakturonan I (RG I)***

Fraksjonen inneholder en del rhamnose, men det er kun spormengder av 1,2 Rha og 2,6 % 1,2,4 Rha. Likevel kan dette, sammen med 1,4 Gal A og 1,3,4 Gal A, tyde på innhold av RG I. Dette er alternerende kjeder av Rha og Gal A med forgreninger i 4-posisjon på rhamnose og 3-posisjon på galakturonsyre.

#### ***Rhamnogalakturonan II (RG II)***

1,4 Gal A og 1,3,4 Gal A kan også stamme fra RG II med forgreninger i 3-posisjon på noen av enhetene, noe som er mer sannsynlig enn at de stammer fra RG I. På disse kjedene kan vi ha T Ara, T Rha og 1,2 Rha. I denne fraksjonen finnes monosakkarider med disse bindingstypene i henholdsvis 9,5%, 13,7% og spor.

#### ***Stivelse / forurensning***

Innhold av 1,4 Glc (4,3%) tyder på innhold av stivelse, men kan også stamme fra celluloseforurensning.

### *Xylaner*

Fraksjonen inneholder noe 1,4 Xyl (6,3%), og dette kan stamme fra xylaner. 1,2,4 Xyl er vanskelig å identifisere i kromatogrammet, men er muligens tilstede. I så fall kan det være bundet T Ara i 2-posisjon på disse. Noe av T Xyl kan være endemolekyler i en slik struktur.

### *Arabinogalaktan I (AG I)*

Om det i det hele tatt er noe av denne strukturen er det i så fall ikke mye. Det er noe T Gal (6,9%), men kun spor av 1,4 Gal og ikke noe 1,3,4 Gal. T Ara og 1,5 Ara er det imidlertid noe mer av, og 1,3,5 Ara er muligens til stede i spormengder. Men disse molekylerne kan stamme fra andre strukturer.

### *Arabinogalaktan II (AG II)*

Gal foreligger mest i bindingsforhold 1,3,6 Gal (8,4%). Sammen med 1,3 Gal (4,4%) kan dette stamme fra AG II, med kjeder av bundet 1,3 Gal med forgreninger 6-posisjon til T Gal, T Ara eller 1,3 Ara.

### *Xyloglukaner*

Innhold av små mengder T Xyl (2,2%) kan, sammen med 1,4 Glc, tyde på at fraksjonen inneholder xyloglukaner med hovedkjede av 1,4 Glc med T Xyl bundet i 6-posisjon på noen glukosemolekyler. Spormengder av T Fuc stammer sannsynligvis fra denne strukturen, og kanskje finnes noe 1,2 Xyl og 1,2 Gal selv om det ikke er funnet i kromatogrammet.

### ***Oppsummering CgLSur<sub>2</sub>III***

Ut fra de bindingstyper som er observert i kromatogrammet ser det ut til at CgLSur<sub>2</sub>II inneholder hovedsakelig homogalakturonan, arabinogalaktan II og xylaner, samt muligens rhamnogalakturonan II.

### **Ikke-metylerte fraksjoner**

Det ble kun funnet spormengder av nativt metylerte forbindelser i CgLSur<sub>2</sub>II i form av 2-OMe Ara og 2-OMe Xyl, og ikke noe i de to andre fraksjonene.

### Kvantitativ og kvalitativ bestemmelse av monosakkaridinnhold etter karboksylsyreduksjon

Etter karboksylsyreduksjonen (metode 4.4.1) ble det foretatt metanolyse og TMS-derivatisering før analyse med GC (metode 4.3.1.1 – 4.3.1.3) for å se hvor stor andel av uronsyrene som var blitt redusert. Det var kun fraksjon CgLSur<sub>2</sub>IIred som det var nok materiale av til å kunne utføre denne testen. Resultatet (tabell 6.1.4) viste at Glc A ble fullstendig redusert til Glc, mens mengde Gal A ikke ble endret i like stor grad. Dette kan delvis forklares ut fra at Glc A sitter lengre ut i molekylet og derfor er mer utsatt for reduksjon enn Gal A, som i stor grad utgjør skjelettet. Men samtidig ser man at reduksjonen i Gal A er mye mindre enn forventet, og også lav sett i forhold til den store økningen i Gal. Mellom disse burde det vært en bedre korrelasjon. Det er usikkert hvorfor man har fått slike resultater, men mulige forklaringer kan være

3. at Gal A toppen er så stor at den kommer utenfor det standardiserte området, med den konsekvens at ikke hele toppens areal er tatt med.
4. at bruk av ultralydbad (eller andre mekaniske hendelser) kan ha ødelagt noen bindinger, noe som vil påvirke prosentfordelingen. Ved å sammenlikne tabell 6.1.4 med tabell 6.1.1, ser man at i tillegg til Gal, Gal A, Glc og Glc A, er også mengde Ara og Rha signifikant endret (begge er redusert).

**Tabell 6.1.4** Tabellen viser prosentvis fordeling av monosakkarider i polysakkaridfraksjonene i CgLSur<sub>2</sub>IIred i forhold til total mengde sukker. Nederste linje viser prøvenes prosentvise innhold av karbohydrat i forhold til innveid mengde frysetørket prøve.

Monosakkarid	CgLSur <sub>2</sub> IIred
Rra	8,8
Rha	5,7
Fuc	0
Xyl	16,7
Man	0,5
Gal	35,5
Glc	5,2
GlcA	0
GalA	27,5
<b>Totalt karbohydratinnhold</b>	<b>72,4</b>

#### 6.1.4.2 Bestemmelse av metanol- og eddiksyreinnhold

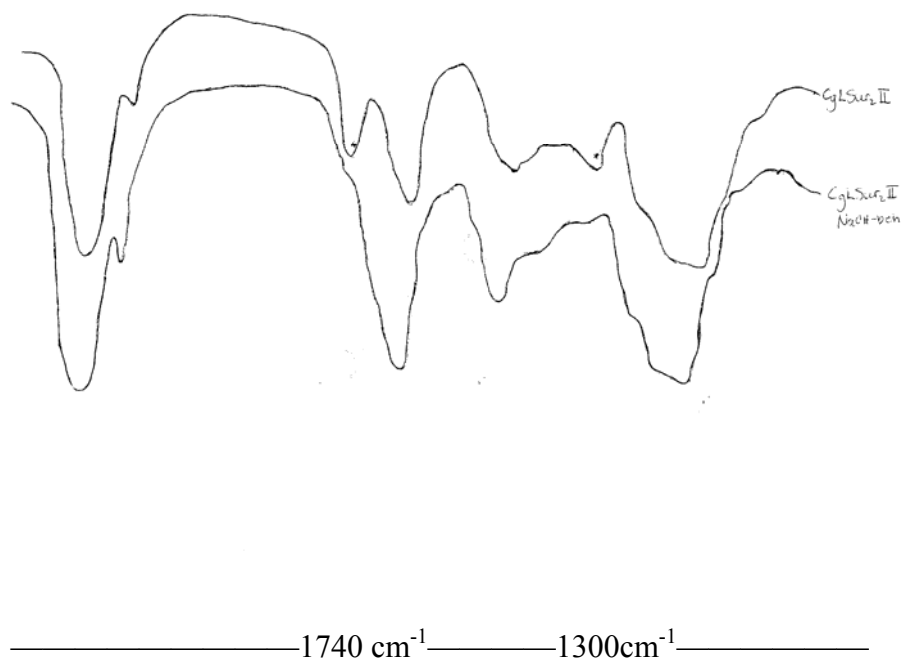
På grunn av det høye innholdet av uronsyrer også i de nøytrale fraksjonene ble det kjørt HPLC omvendt-fase-kolonne med IR-detektor for å bestemme esterifiseringsgrad av metanol (DMe) på syregruppene og eddiksyre (DAc) på OH-gruppene. Resultatet (tabell 6.1.5) viste en overraskende stor esterifiseringsgrad, noe som kan tyde på interferens og at metoden ikke er egnet til såpass urene stoffer. Vi kan med stor sannsynlighet si at prøvene inneholder metanol og eddiksyre, men det foreligger en stor usikkerhet omkring mengde.

**Tabell 6.1.5** Tabellen viser prosentvis esterifiseringsgrad ut fra prøvenes innhold av metanol og eddiksyre, beregnet i forhold til total sukkermengde, mengde galakturonsyre (Gal A) og total mengde uronsyre (galakturonsyre og glukuronsyre).

Innveid mengde	DMe, % sukker	DMe, % Gal A	DMe, % uronsyre	DAc, % sukker	DAc, % Gal A	DAc, % uronsyre
CgLSur <sub>2</sub> I 5,0 mg	36,6	364	104,6	28,0	277,2	79,8
CgLSur <sub>2</sub> II 5,0 mg	21,5	67,3	55,1	15,7	49,2	40,3

#### 6.1.4.3 IR-spektroskopi

For å undersøke nærmere om innhold av naturlig foretrede molekyler ble det utført IR-spektroskopi på CgLSur<sub>2</sub>II. Innhold av estergrupper vil gi et bredt absorpsjonsbånd ved 1740 cm<sup>-1</sup>, samt et mindre bånd ved ca 1300 cm<sup>-1</sup>. Øverste graf i figur 6.1.9 viser tydelig disse toppene, merket\*. Etter deesterifisering med NaOH forsvant disse toppene (nederste graf), noe som bekrefter naturlig forestring av syregruppene.



**Figur 6.1.9** IR-spekter av CgLSur<sub>2</sub>II (øverst). I tillegg er det tatt med en kurve for NaOH-behandlet CgLSur<sub>2</sub>II (nederst) hvor estertoppene ikke er tilstede.

#### 6.1.4.4 Enzymdegradering

Fraksjonene CgLSur<sub>2</sub>II ble enzymatisk degradert med endo-polygalacturonanase (metode 4.4.9) for å isolere de forgrenete områdene ("hairy regions") i pektinene. Den nye fraksjonene ble kalt CgLSur<sub>2</sub>Ilenz. Deretter ble den nye fraksjonen separert på PD-10-kolonne (metode 4.2.4.3), og det ble utført metanolyse og GC (metode 4.3.1.1 - 4.3.1.3), metylering og GC-MS (metode 4.4.1 - 4.4.6), samt komplementfikseringstest (metode 4.6.1) på den.

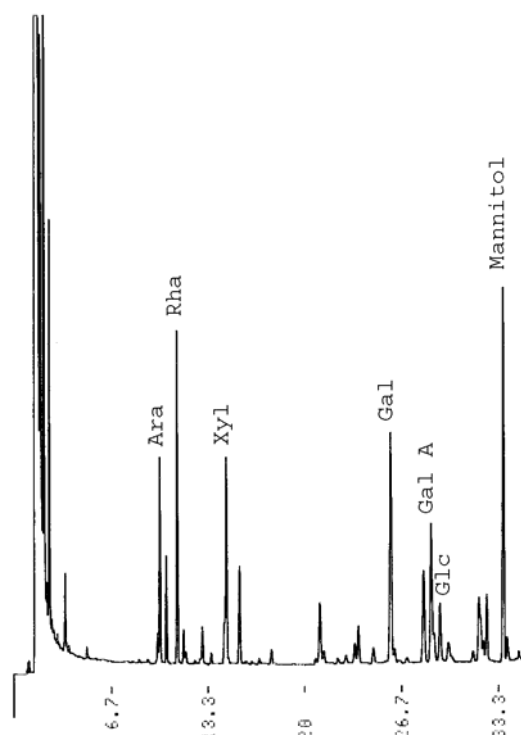
## 6.2 SEPARASJON PÅ PD-10 OG ANALYSE PÅ NYE FRAKSJONER

Etter enzymatisk degradering ble polysakkaridfraksjonene separert etter synkende molekylstørrelse på en PD-10-kolonne. Ved hjelp av fenol-svovelsyretesten ble noen av fraksjonene slått sammen og analysert med hensyn på monosakkaridinnhold (metode 4.3.1.1-4.3.1.3), komplementfikserende aktivitet (4.6.1) og bindingsforhold (4.4.1-4.4.6)

### 6.2.1 Kvantitativ og kvalitativ bestemmelse av monosakkaridinnhold

#### 6.2.1.1 Metanolyse og GC

Monosakkaridsammensetningen ble bestemt kvantitativt og kvalitativt ved metanolyse, TMS og gasskromatografi (metode 4.3.1.1-4.3.1.3).



**Figur 6.2.1** Gasskromatografiresultat av monosakkaridbestemmelse for CgLSur<sub>2</sub>Ienz.

**Tabell 6.2.1** Tabellen viser prosentvis fordeling av monosakkarider i polysakkaridfraksjonene i forhold til total mengde sukker. Nederste linje viser prøvens prosentvise innhold av karbohydrat i forhold til innveid mengde frysetørket prøve.

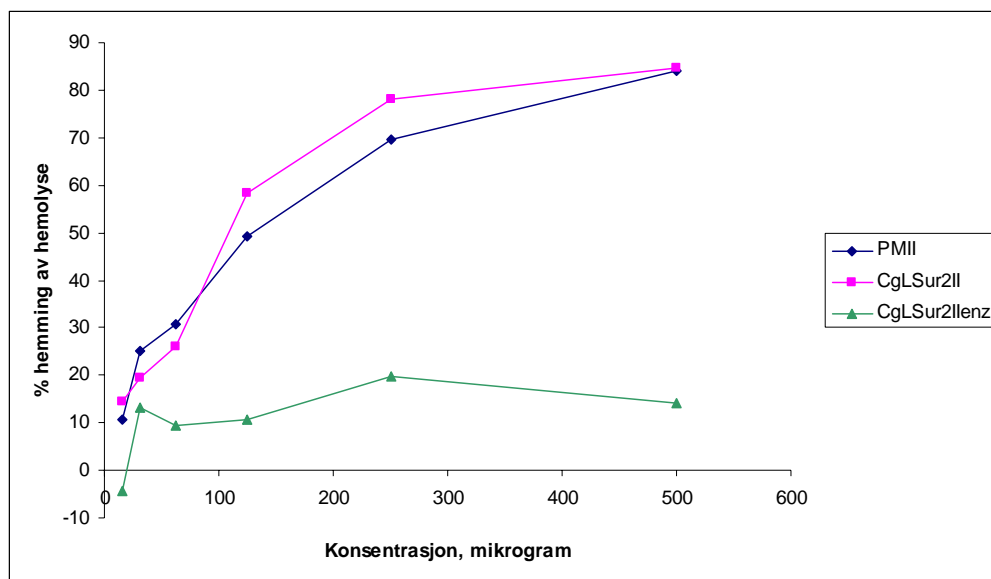
Monosakkarid	CgLSur <sub>2</sub> Ienz
Ara	12,3
Rha	14,6
Fuc	0,0
Xyl	15,5
Man	0,0
Gal	26,6
Glc	2,3
GlcA	0,0
GalA	28,8
<b>Totalt karbohydratinnhold</b>	<b>92,4</b>

Fraksjonen inneholder en god del galakturonsyre, noe som kan tyde på innhold av homogalakturenan. CgLSur<sub>2</sub>Ienz inneholder spesielt mye galaktose, som sammen med arabinose kan inngå i arabinogalaktaner. Det er også mye xylose som kan stamme fra xylaner og /eller xyloglukaner. Rhamnose og galakturonsyre indikerer innhold av rhamnogalakturenaner.

## 6.2.2 Biologisk aktivitet

### 6.2.2.1 Komplementfikseringstesten

Komplementfikseringstesten (metode 4.6.1) ble utført på den enzymdegraderte fraksjonen CgLSur<sub>2</sub>Ienz for å undersøke biologisk aktivitet i denne fraksjonen, og deretter sammenlikne denne med aktiviteten funnet hos den samme fraksjonen før enzymdegradering. Det ble samtidig utført en ny test på CgLSur<sub>2</sub>II. Resultatene er tegnet inn i samme figur (figur 6.2.2). Ved degradering med endo-polygalacturonanase vil de forgrenede områdene ("hairy regions") isoleres, og ved å sammenlikne aktiviteten til fraksjonene før og etter degraderingen kan man få informasjon om aktiviteten til de forgrenede områdene. Figur 6.2.2 viser fraksjonens aktivitet på komplementsystemet både før og etter enzymehandling, sammenliknet med PMII som standard. Høye hemolyseverdier korrelerer til høy komplementfikserende aktivitet. Den enzymbehandlede fraksjonene viser langt lavere aktivitet enn den ikke-enzymbehandlede fraksjonen, og oppnådde ikke 50% hemming av hemolyse, såkalt ICH50.



Figur 6.2.2 Komplementfikserende aktivitet for CgLSur<sub>2</sub>II og CgLSur<sub>2</sub>IIenz, sammenliknet med PMII. Alle prøver er løst i veronalbuffer.

## 6.2.3 Strukturoppklaring

### 5.5.3.1 Bestemmelse av bindingsforhold i fraksjonene

Bindingsforholdene mellom monosakkaridene i de isolerte polysakkaridene etter enzymdegradering og separasjon på PD-10-kolonne ble bestemt ved hjelp av karboksylsyre-reduksjon og påfølgende metylering (metode 4.4.1-4.4.5) og GC-MS (metode 4.4.6). Tabell 6.2.2 viser det prosentvise innholdet av de ulike monosakkaridene etter bindingstype. Tallene er fremkommet etter bearbeidelse av kromatogrammet, samt bruk av prosentvis totalinnhold av de ulike monosakkaridene funnet ved metanolyse, TMS-derivatisering og GC (metode 4.3.1.1-4.3.1.3) (tabell 6.6.1) for den aktuelle prøven. Noen av toppene i kromatogrammet overlapper hverandre slik at mengde beregnet ut fra areal ikke er helt korrekt.



**Tabell 6.2.2:** Tabellen viser prosentvis innhold av de ulike monosakkaridene basert på bindingsforhold, beregnet ut fra arealer i GC-MS-kromatogram og GC-kromatogram

Monosakkarider og deres bindingstype	CgLSur <sub>2</sub> Henz
T Araf	9,5
1,3 Araf	1,0
1,5 Araf	1,8
T Xyl	15,5*
T Rha	12,8*
1,2,4 Rha	1,8
T Gal	8,9
1,6 Gal	2,3
1,3 Gal	5,0
1,3,6 Gal	7,1
1,3,4,6 Gal	3,3
T Glc	0,9*
1,4 Glc	1,4
T GalA	
1,4 GalA	28,8
T GlcA	0*/**
<b>Totalt</b>	<b>100,1</b>

\* Stoffer som deler topp med et annet stoff, mengde beregnet ut fra mengder av viktige molekyler i kromatogrammet

\*\* Det er funnet noe TGlC A ved GC-MS, men ikke ved GC, det blir derfor 0 ved beregning selv om det sannsynligvis er små mengder tilstede.

I den videre diskusjonen ses det på mulighetene for tilstedeværelse av de viktigste strukturelle plantepolysakkaridene; homogalakturonan, rhamnogalakturonan I og II, xylaner, arabinogalaktan I og II, xyloglukaner og stivelse. Flere av disse har vist å ha biologisk aktivitet (3.2.2).

### **Bindingsforhold i CgLSur<sub>2</sub>Henz**

#### *Homogalakturonan*

Den enzymdegraderte fraksjonen inneholder mye 1,4 Gal A (28,8%), og mye av dette stamme sannsynligvis fra lineære områder bestående av homogalakturonan. Fraksjonen inneholder imidlertid tilsynelatende ikke noe 1,3,4 Gal A, noe som viser at galakturonankjeden ikke har noen forgreninger i 3-posisjon.

### *Rhamnogalakturonan I (RG I)*

Fraksjonen inneholder en del rhamnose. 1,2 Rha er ikke observert, men 1,2,4 Rha er det 1,8% av. Tilstedeværelse av 1,2 Rha, sammen med 1,2,4 Rha, 1,4 Gal A og 1,3,4 Gal A, kan tyde på innhold av RG I. Dette er alternerende kjeder av Rha og Gal A med forgreninger i 4-posisjon på rhamnose og 3-posisjon på galakturonsyre. Siden verken 1,2 Rha eller 1,3,4 Gal A er observert er det lite trolig at denne strukturen foreligger, i alle fall i betydelige mengder.

### *Rhamnogalakturonan II (RG II)*

1,4 Gal A og 1,3,4 Gal A kan også stamme fra RG II med forgreninger i 3-posisjon på noen av enhetene. På disse kjedene kan vi ha T Ara, T Rha og 1,2 Rha. I denne fraksjonen finnes monosakkarider med disse bindingstypene i henholdsvis 8,9%, 5,4% og spormengder. Heller ikke denne rhamnogalakturonanstrukturen ser det ut til å være noe særlig av i og med at det ikke er funnet 1,2 Rha eller 1,3,4 Gal A.

### *Stivelse / forurensning*

Innhold av 1,4 Glc (1,4%) tyder på innhold av stivelse, men kan også stamme fra celluloseforurensning.

### *Xylaner*

Det er ikke sett verken 1,4 Xyl eller 1,2,4 Xyl i denne fraksjonen som kan stamme fra xylaner.

### *Arabinogalaktan I (AG I)*

Om det i det hele tatt er noe av denne strukturen er det i så fall ikke mye. Det er noe T Gal (8,9%), men verken synlige mengder av 1,4 Gal, 1,3,4 Gal eller 1,3,5 Ara. T Ara og 1,5 Ara og er det imidlertid små mengder av. Men disse molekylerne kan stamme fra andre strukturer.

### *Arabinogalaktan II (AG II)*

Gal foreligger mest i bindingsforhold 1,3,6 Gal (7,1%). Sammen med 1,3 Gal (5,0%) kan dette stamme fra AG II, med kjeder av bundet 1,3 Gal med forgreninger 6-posisjon til T Gal, T Ara eller 1,3 Ara.

### *Xyloglukaner*

Innhold av store mengder T Xyl (15,5%) kan, sammen med 1,4 Glc, tyde på at fraksjonen inneholder xyloglukaner med hovedkjede av 1,4 Glc med T Xyl bundet i 6-posisjon på noen

glukosemolekyler. Spormengder av T-Fuc, 1,2 Xyl og 1,2 Gal kan være tilstede selv om de ikke er observert.

### ***Oppsummering***

Ut fra de bindingstyper som er observert i kromatogrammet ser det ut til at CgLSur<sub>2</sub>Ienz inneholder AG II og xyloglukaner, samt en del uforgrenede homogalakturonankjeder.

## 7. RESULTATER FRA FELTARBEID I MALI

### 7.1 Healerintervjuer

I perioden 21.januar til 2.februar 2006 ble det utført intervjuer av 45 tradisjonelle healere i to forskjellig områder i Mali. Fra 21. til 24.januar ble 16 healere fra 13 landsbyer i Kolokaniområdet intervjuet, og fra 28.januar til 2.februar ble 29 healere fra 15 landsbyer i Dioilaområdet intervjuet.

Det ble innhentet opplysninger om flere planter, men i denne oppgaven er kun opplysninger om *C. glutinosum* tatt med. Resultatene fra intervjuene er oppsummert i tabell 7.1.1 og tabell 7.1.2

#### 7.1.1 Kolokanidistriktet

Feltarbeidet ble utført i perioden 21. – 24. januar 2006. 16 tradisjonelle healere fra 13 forskjellige landsbyer ble intervjuet; 2 kvinner og 14 menn. Alle benytter *Combretum glutinosum* i sin praksis, og alle bruker det lokale navnet Tiangara. Anvendelsesområdene er mange, totalt 27. Noen av dem kan være de samme selv om healerene hadde litt forskjellig betegnelse, f.eks ”sår” og ”indre sår”, ”malaria” og ”nevrologisk malaria”. De hyppigst nevnte indikasjonene var diare/dysenteri (5), malaria (5) og feber (4). To healere anvender også ”gyi” fra *C.glutinosum*; parasittvekster fra *Lorathacea*-familien. Opplysninger om disse parasittplantene ble gitt ved spørsmål om bruk av ”Tiangara”, og de er derfor tatt med i oppgaven. Resultatene fra healerintervjuene er oppsummert i tabell 7.1.1.

**Tabell 7.1.1** Oversikt over informasjon som ble hentet inn under healerintervjuer i Kolokaniområdet.

Healerens navn, alder og dialekt	Landsby Populasjon	Opplysninger om praksisen	Indikasjon	Plantedel, tilberedning og administrasjon
Samba Diarra 51 år	Diecouma, 40 km fra Kolokani	4-5 pasienter/dag	Magesmerter	<b>Rot.</b> Ta av og kast den ytre barken. Den indre barken tørkes, males til fint pulver og blandes med litt salt.

## 7. Resultater fra feltarbeid i Mali

Bambara			<p>Dysenteri</p> <p>Bad spirit</p> <p>Hemorroider</p> <p>Otitt</p>	<p>1 ts blandes med grøt eller kaffe, og drikkes 2 ganger daglig (morgen og kveld)</p> <p><b>Rot.</b> Som ved magesmerter.</p> <p><b>”Gui”.</b> Dampbad med ”gui” (skudd av et annet tre på treet).</p> <p><b>Stammebark.</b> 1 ts pulver blandes med ½ L vann. Kan enten drikkes eller appliseres rektalt.</p> <p><b>Unge blader.</b> 2-3 dråper dekokt dryppes i øret.</p>
<p>Kassoum</p> <p>Traore</p> <p>56 år</p> <p>Bambara</p>	<p>Fra Tao-</p> <p>Tomo</p> <p>Bor i</p> <p>Kolokani</p>	<p>5-7</p> <p>pasienter/dag,</p> <p>men store</p> <p>variasjoner</p>	<p>”Mara” – en parasittsykdom forårsaket av onchocerca volvulus</p> <p>Hjertesykdom</p>	<p><b>Blad.</b> Totalt 9 bunter til menn og 12 bunter til kvinner.</p> <p>Dag 1: 3 (4) bunter i 3 (4) L vann. Kokes i 1 time. 1 kopp av dekoktet drikkes, resten brukes til dampbad av rygg og mage, samt til inhalasjon. Doseres morgen, midt på dagen og kveld i 3 dager.</p> <p>Dag 4: Samme prosedyre som over. Dekoktet brukes i 3 dager.</p> <p>Dag 7: Samme prosedyre som over. Dekoktet brukes i 3 dager.</p> <p><b>Blad.</b> 3 (4) bunter kokes som ved ”mara”. Dekoktet drikkes og brukes til bad.</p>

## 7. Resultater fra feltarbeid i Mali

			Magesmerter	<b>Rot.</b> Røtter fra øst- og vestsiden av treet blandes med røtter fra Nauclea latifolia. 1 håndfull av hver blandes i 1 ½ L vann. Blandingen kokes lenge, til den har fått en gulbrun farge. Dekoktet drikkes.
N`golo Coulibaly 67 år Bambara	Fra Seabougou Bor/jobber i Kolokani	5-6 pasienter/dag	Urinerings- besvær hos eldre menn  Urinerings- smeter (brennende følelse) (muligens UVI eller gonoré)  Migrene/ hodepine  Sår	<b>Blad.</b> En ubestemt mengde blader (fullt kokekar) kokes med 2 L vann i 1 time. 2 glass nr 8 av dekoktet drikkes 2 ganger daglig.  <b>Rotbark.</b> 1 håndfull bark blandes i ½ L vann, og trekkes i 3 timer ved romtemperatur. Blandingen drikkes. Gjenta prosedyren i 3 dager.  <b>Stammebark.</b> Barken tørkes og pulveriseres. 1 klype legges på varme, og røyken inhaleres.  <b>Rotbark.</b> Såret vaskes med vann, og pulverisert rotbark drysses på såret. <b>Rot.</b> Man kan også gni to røtter mot hverandre slik at det siver ut en væske som man smører på såret.
Koncoura Diarra (k) 63 år Bambara	Fra Sido Bor/jobber i Kolokani	3-5 pasienter/dag	Smerter ved tannvekst hos barn	<b>Blad.</b> 3 (4) bunter kokes lenge i rent vann og utstyr. Dekoktet (2-3L) drikkes og brukes til kroppsvask i 3 (4) dager. Oppbevares nøyte. Lag nytt dekokt med samme blader hver dag.

## 7. Resultater fra feltarbeid i Mali

[illegible]

## 7. Resultater fra feltarbeid i Mali

Famory Traoré 46 år Bambara	Sebekoro, 5 km fra Kolokani	5-10 pasienter/dag	Nevrologisk malaria hos barn / feber      Urinretensjon, renser urinsystemet	<b>Blad.</b> 2 bunter <i>C.glutinosum</i> og 2 bunter <i>Pliostigma reticulatum</i> (Niamaceni) kokes i 3 L vann i 1 ½ time. Drikk 1 ss av dekoktet 3 ganger daglig.  <b>Blad og rot.</b> 3 (4) bunter og en liten mengde rot kokes i 3 L vann i 1 ½ time. Drikk 1 glass nr 8 av dekoktet 3 ganger daglig (morgen, midt på dagen, kveld)
Tiegnéri Diarra 52 år Bambara	Tienegue- bougou, 4 km fra Kolokani	5-15 pasienter/dag  President i healer- assosiasjonen	Diaré      Urinretensjon   Feber hos barn  ”Missikolo” Sovesyke/ narkolepsi?   Malaria	<b>Blad.</b> 3 (4) bunter i 3 L vann kokes inn til 1 ½ L. Drikk 1 glass nr 8 av dekoktet 3 ganger daglig (morgen, midt på dagen, v/sengetid)  <b>Blad.</b> Som ved diaré.  <b>Blad.</b> Dekokt til vask og drikke i 3 dager  Som ved feber hos barn.  <b>Rot og stammebark</b> pulveriseres. 3 klyper (3 fingre) pr dag i 7 dager. Blandes med mat. Brukes sammen med andre ikke navngitte planter.
N` Goukoura Traoré (k) 72 år	Kolokani	Inntil 4 pasienter/dag  Spesialist på	Konstipasjon	<b>Blad.</b> Dekokt av 1 bunt og litt grunnsalt (ikke marint). Drikk et volum som fyller magen.



## 7. Resultater fra feltarbeid i Mali

		behandling av barn	Skader	<b>Unge eller små blader.</b> Puveriseres og tørkes 1 dag før det appliseres på skaden.
Moussa M. Kéita 50 år	Fra Kangaba, bor og jobber i Kolokani	2-3 pasienter/dag  Jobber for assosiasjonen	Malaria  Hypertensjon	<b>Blad.</b> Vaskes, pulveriseres og oppbevares i boks. 1 klype (3 fingre) has i 1 glass nr 8 med kokende vann, trekkes 2-3 min og drikkes 3 ganger daglig (morgen, midt på dagen og kveld) i 3 dager.  Som ved malaria, men kontinuerlig bruk.
Namassé Traore 55 år	Kolokani	5 pasienter/dag	Konstipasjon  Malaria  Migrene/hodepine	<b>Blad.</b> 1 glass nr 8 med pulver blandes med ½ L vann, kokes i 1 ½ time og filtreres. Drikk 1 glass nr 8 3 (4) ganger daglig (morgen, formiddag, ettermiddag og kveld).  <b>Blad.</b> Som ved konstipasjon  <b>Blad.</b> Dekokt av 3 bunter blader i 1 ½ L vann. Brukes til dampbad med klede over hodet, og deretter vask av hodet.
Wori Coulibaly (k) > 60 år	Fra Tao-Tomo Bor og jobber i Kolokani	Store variasjoner	Hovedsakelig til barn og spedbarn  Anemi	<b>Blad.</b> Dekokt av 4 bunter blader i 2 L vann. Kroppsvask 2 ganger daglig (morgen og kveld) i 4-8 dager. Til spedbarn brukes i tillegg tradisjonell såpe.

## 7. Resultater fra feltarbeid i Mali

			Malaria	<b>Blad.</b> Dekokt av 3 (4) bunter. Drikk 1 håndfull og vask hele kroppen, inkl hodet.
Namasson Kané Ca 58 år	Falaka, 7 km fra Kolokani	4 pasienter/dag	Feber, spesielt hos babyer	<b>Blad.</b> Dekokt av 3 (4) bunter i 2 L vann, innkokt til 1 L. Drikk ca ¼ L 2 ganger daglig i 3 dager.
Fassey Konaré 65 år	Zorokoro, 5 km fra Kolokani	> 20 års praksis 5-10 pasienter/dag	Dysenteri      Hodepine      Konjunktivitt	<b>Unge, røde blader.</b> 2-3 blader tygges 1 gang daglig. Saften svelges, resten spyttes ut og legges til tørk i sanden. Diareen opphører når disse er tørket.  <b>Blad.</b> Dekokt av 3 (4) bunter i en dekkende vannmengde. Kokes 5 min i et leirfat (ikke jern). Dampbad morgen og kveld.  <b>Blad.</b> Preparering som ved hodepine. Vask øynene med dekoktet, ha øynene åpne.
Tiévari Diarra > 60 år	Sébécoro, 5 km fra Kolokani	Ca 20 års praksis 5 pasienter/dag	Indre sår, spesielt hos barn	<b>Blad.</b> Dekokt av 3 (4) bunter i 1 ½ L vann. La koke ca 15 min. Helles på flaske ("Callebasse"/gresskarskål)). Drikk 1-2 glass nr 8 midt på dagen og kveld. Det kan også brukes pulver 2 klyper (3 fingre) som blandes med litt vann og drikkes 2 ganger daglig.
Tio Traoré Ca 80 år	Tiorebarobo	Ca 40 års praksis 20 pasienter/dag	Langvarig hudsykdom     Diaré	<b>"Gui".</b> Lag dekokt av pulverisert "gui". Drikk 2 glass nr 8 1 gang daglig i 5 dager.  <b>Unge røde blader.</b> Pulveriserte blader blandes i vann. Drikk i 2 dager.

			Dysenteri	<b>Unge røde blader.</b> Som ved diaré
--	--	--	-----------	--

**Generelle kommentarer:**

- Tall i parentes er for kvinner. Må ofte ha mer pga de blir hardere rammet av sykdommen.
- Glass nr 8 rommer ca 75 ml
- I arboretet fikk vi høre at det er forskjell på han- og hunntreet. Av utseende er hunntreet lysere i stammebarken enn hanntreet. Stort sett samme anvendelsesområde, men noen healere kan skille mellom dem i spesielle tilfeller.

**7.1.2 Dioiladistriktet**

I Dioiladistriktet ble det intervjuet 29 healere fra 15 landsbyer, og alle benytter *C. Glutinosum* i sin praksis. 11 healere anvender også "gui" fra *C.glutinosum*, parasittvekster fra *Lorathacea*-familien. Opplysninger om disse parasittplantene ble gitt ved spørsmål om bruk av "Tiangara", og de er derfor tatt med i oppgaven. Det ble nevnt 44 forskjellige indikasjoner, men noen av dem kan være det samme selv om healerene bruker ulike benevnelser. Malaria (6) og indre sår (6) var de hyppigst nevnte idikasjonene.

**Tabell 7.1.2** Oversikt over informasjon som ble hentet inn under healerintervjuer i Dioilaområdet.

Healerens navn, alder og dialekt	Landsby Populasjon	Opplysninger om praksisen	Indikasjon	Plantedel, tilberedning og administrasjon
N'golo Sidibé 46 år Bambara	Dioila	5 pasienter/dag	Barne-sykdommer	<b>Blad.</b> 3 håndfuller blader i 2-3 L vann. Bladene plukkes i et sånt klede som barn bæres på ryggen i. Kok lenge (1 time er nok) , og gi dekoktet til babyen. Vask også med tradisjonell såpe og dekokt. Mengde blader bestemmes individuelt.

## 7. Resultater fra feltarbeid i Mali

Mossa Sidibé 54 år Bambara	Dioila	5-7 pasienter/dag	Angst	<b>”Gui”</b> . 1 ”5-fingerklype” pulver blandes med vann og brukes til bad 1 gang daglig
			Uflaks	<b>”Gui”</b> . Som ved angst
			Hodepine	<b>”Gui”</b> . Brukes sammen med ”gum” fra Comfora Afrikana. 1 ”3-fingerklype” legges i en skål på bålet, og røyken inhaleres 3 ganger daglig (morgen, midt på dagen, kveld).
			Tretthet	<b>Blad</b> . Dekokt av 3 bunter i 3-4 L vann brukes til bad. Varmes til kokepunktet, tas deretter av varmen. Pulver blandet i karitésmør smøres på kroppen.
			Artrose	<b>Rotbark</b> . 1 ”5-fingerklype” pulver blandes med 1 glass nr 8 karitésmør. Appliseres lokalt på artrose 3 ganger daglig.
			Hemorroider	<b>Rotbark</b> . Som ved artose.
			Hoste	<b>Blad</b> . Pulveriseres og blandes med litt salt. 1 ”3-fingerklype” tas i munnen 3 ganger daglig.

## 7. Resultater fra feltarbeid i Mali

Yamoussa Mariko 56 år Bamabara	Wolomin	20 pasienter per dag 28 års erfaring	Diabetessår på armer og ben  Mørkredd  Muskel- smerter	<p><b>Blad.</b> Dekokt av 3-7 bunter i 3-4 L vann. Kokes lenge. ½ L drikkes morgen og kveld. Hvis nok, brukes dekoktet også til vask. Hvis det ikke er nok kan man vaske med vann.</p> <p><b>Stammebark</b> fra det røde hanntreet pulveriseres og appliseres på sårene etter vask .</p> <p><b>Stammebark.</b> 1 håndfull kokes lenge i 1 L vann. Drikk ½ L morgen og kveld i 1 uke.</p> <p><b>Blad.</b> 7 bunter kokes i en vannmengde som er stor nok til å kunne ta bad i i 7 dager. Drikk ½ L av dekoktet.</p>
Dramane Mariko 80 år Sjef i landsbyen Bambara	Fignana	>4 pasienter per dag, hovedsaklig kvinner	Malaria   Inflammasjon	<p><b>Unge røde blader.</b> Dekokt av 3 (4) bunter. Kokes i ”canary” full med vann til løsningen blir rød. Drikk ¼ L og ta bad hver morgen. Bruk samme bladbunter i 3-4 dager før de skiftes ut.</p> <p><b>”Gui”</b> forkulles og pulveriseres. 1 håndfull pulver blandes med ½ L karitésmør. Appliseres 1 gang daglig.</p>

## 7. Resultater fra feltarbeid i Mali

Mah Tenin Fomba 80 år (kvinne)	Fignana	Ca. 10 pasienter per dag. Spesialist på babyer/barn. Jobber hele dagen. Praktisert i >52 år	Dårlig fordøyelse hos små barn  Diaré hos små barn  Interne sår hos små barn	” <b>Gui</b> ”, små grener/stilker og blader. Kok lenge. Drikk 2 ts av dekokt bruk resten til bad.  ” <b>Gui</b> ”. Som ved dårlig fordøyelse.  ” <b>Gui</b> ”. Som ved dårlig fordøyelse.
Mamoutou Togola 54 år	Fignana	Ca 5 pasienter per dag  Har praktisert i 16 år	Diaré   Forebygge nevrologisk malaria hos foster/nyfødt.  Sår	” <b>Gui</b> ”. 1 håndfull kokes 3-4 timer med 1 L vann. Dekoktet oppbevares på flaske. Drikk 1 glass nr 8 morgen og kveld.  ” <b>Gui</b> ”. Som ved diaré. Gis til gravide kvinner fra 5.måned og frem til fødsel.  <b>Unge, røde blader.</b> 4 bunter kokes lenge i 4 L vann. Bruk dekoktet til sårvaske 1 gang daglig. <b>Stammebark</b> pulveriseres og appliseres på sår etter vask.
Sina Mariko 50 år	Fignana	3-4 pasienter per dag  6 års erfaring	Diaré   Sår	<b>Unge blader.</b> 3 bunter kokes i 3 timer med 2-3 L vann. Drikk 1 ts 3 ganger daglig i 3 dager.  <b>Blader.</b> 3 bunter kokes med 2 L vann. Vask såret godt med dekoktet. <b>Rotbark</b> pulveriseres og appliseres såret etter vask, daglig inntil bedring oppnås, deretter hver annen dag.

## 7. Resultater fra feltarbeid i Mali

Madou Diakité 64 år	Fignana	4-5 pasienter per dag. Overtatt etter faren sin, holdt på i ca 20 år.	Diaré hos barn  Angst/redsel	<b>”Gui”</b> kokes med 1 L vann. Drikk 2 ts morgen og kveld i 7 dager. Vask barnet med resten.  <b>Stammebark</b> kokes med stammebark fra <i>Pterocarpus erinaceus</i> . Bruk 1 håndfull av hver i ½ L vann. Drikk 1-2 glass nr 8 pr dag i 7 dager.
Seydou Fané 65 år	Fignana	Vet ikke antall pasienter per dag, han behandler de som kommer. Er smed i tillegg.	Ødem  Forstuelse	<b>Røtter</b> kuttes i biter á 15 cm. 4 rotbiter fra <i>C. glutinosum</i> og 4 rotbiter fra <i>Cassia siberiana</i> kokes med ca 4 L vann i 1 time. Drikk 2-3 håndfulle, og ta dampbad og bad morgen og kveld i 7 dager.  <b>Røtter</b> . Tillages som over, men uten <i>Cassia siberiana</i> . Drikkes.
Moumini Mariko 53 år	Fignana	Vet ikke. Hjelper folk når de er syke, men det er ikke hans eneste jobb. Praktisert i 10 år	Artrose  Hjerte- /magelidelser, muligens halsbrann  Nevrologisk malaria hos barn	<b>Blader</b> . 3-4 bunter kokes i 1 ½ L vann. Brukes til dampbad lokalt. Utfør massasje med blader fra dekoktet 1 gang daglig.  <b>Rotbark</b> blandes med litt grunnsalt (ikke marint). 1 ”3-fingerklype” tas rett i munnen morgen og kveld.  <b>”Gui”</b> knuses, tørkes 1 dag, pulveriseres og blandes med vann. Vask det syke barnet.

## 7. Resultater fra feltarbeid i Mali

Mariam Traoré (kvinne) 57 år	Dianna 7 km fra Dioila	10 pasienter per dag  5 års erfaring	Interne sår	<b>Blader</b> , alle typer kan brukes (røde, hvite, små). 1 håndfull blader kokes i 2 glass nr 8 med vann inntil volumet er halvert. Drikk 1 glass nr 8 hver morgen. Ved et tidlig sårstadium holder det å behandle i noen få dager, men dersom såret er gammelt må man drikke dekoktet over en lengre periode.
			Malaria	<b>Blad</b> . 3-4 bunter kokes i 4 L. Drikk ½ L og ta bad.
			Leddsmerter	<b>Blad</b> . Som ved malaria.
Soumaila Diakité 60 år	Fignana	10 pasienter per dag. Har praktisert i 50 år, lært av sin far som også var healer.	Nevrologiske sykdommer  Humørsyke  Hukommelses- problemer	<b>Blad</b> . 3 bladbunter kokes i 5 L vann. Drikk og ta bad.
			Onde ånder	<b>”Gui”</b>
Sidi Konaté 65 år	Sirima- bougou  Ca 25 km fra Dioila	5-10 pasienter per dag 10 års erfaring Spesialist på barne- sykdommer	Oppblåst mage og diaré	<b>Blad</b> . 3-4 bunter kokes lenge i en ”marmit” (spesiell kjele som rommer 3-4 L). Drikk 3 håndfulle 1 gang daglig i 4 dager.
			Hallusina- sjoner	<b>”Gui”</b> . 1 håndfull kokes i 2 L vann i ½ time. Drikk 3 håndfulle av dekoktet og ta bad i resten i 3 dager.
			Mareritt	<b>”Gui”</b> . Som ved hallusinasjoner



## 7. Resultater fra feltarbeid i Mali

Sirima Brama Konaté 60 år	Sirima- bougou  Ca 25 km fra Dioila	5-6 pasienter per dag  10 års praksis	Lettere fødsel  Oppblåst mage  Transpirasjon  Forstuelse	<b>Blad.</b> 3 bunter kokes med vann. Dekoktet brukes til vaske gravide kvinner.  <b>Små blader.</b> 1 bunt kokes i 3 L vann i 1 ½ time. Drikk ½ L av dekoktet hver dag.  <b>Unge blader.</b> Dekokt 3 L drikk ¼ L 1 gang daglig.kok 1 ½ t  <b>Blad.</b> Lag et dekokt som brukes til massasje. Ingen spesielle mengder.
Zoumana Konaté 63 år	Sirima- bougou  Ca 25 km fra Dioila	5-8 pasienter per dag  30 års erfaring	Malaria og ikterus   Svimmelhet  Somnolens	<b>Rot.</b> 1 håndfull rotbiter fra C.glutinosum blandes med 1 håndfull rotbiter fra A.leocarpus og 2 L vann. La trekkes en dag ved romtemperatur. Drikk 1 glass nr 8 hver morgen i 3 dager.  <b>Rot.</b> 3 små rotbiter kokes med vann i 4 timer. Drikk 2 glass nr 8 hver dag i 3 dager.  <b>Rot.</b> Som ved svimmelhet
N'Pié Mariko 101 år	Dinkoro	Vet ikke hvor mange pasienter han har per dag	Diaré	<b>Blad.</b> 3 (4) bunter kokes lenge i 3 (4) L vann. Drikk så mye av dekoktet at det fyller magen, i 2-3 dager.

## 7. Resultater fra feltarbeid i Mali

Zankoura Mariko > 50 år	Dinkoro	5-6 pasienter per dag 20 års erfaring	Afrodisium	<b>Rotbark.</b> Barken tørkes, pulveriseres og blandes med litt salt. 1 ”3-fingerklype” tas rett i munnen.
Mi Dagnoko 98 år  Sjef i landsbyen og av jegerne	Falakonon, 40 km fra Dioila	40 pasienter per dag 70 års erfaring	Svakhet hos barn  Inflammasjon	<b>Blad</b> og ”gui”. 3 (4) bunter varmes til kokepunktet. Dekoktet brukes til dampbad og vask, samt at 2 glass nr 8 drikkes 1 gang daglig.  <b>Blad.</b> 3 (4) bunter varmes til kokepunktet. Dekoktet brukes til bad. Etter bad appliseres en blanding av pulveriserte blader og karitésmør på det infammerte stedet. Gjøres 2 ganger daglig i 3-4 dager.
Nianzon Togola > 70 år	Falakonon	5 pasienter per dag 50 års erfaring	Hodepine  Brystsmerter  Puste- og hjerter- problemer	<b>Blad.</b> 3 (4) bunter kokes lenge i 2 L vann. Dekoktet brukes til dampbad og vask av hodet 3-4 ganger.  <b>Små blader.</b> 3 (4) bunter kokes med litt karitésmør. Ta dampbad på brystet, og appliser litt smør på brystet i 4-5 dager.  <b>Små blader.</b> Som ved brystsmerter.
Soungalo Tiero 50 år	Falakonon	4 pasienter per dag 30 års erfaring	Diaré / dysenteri	<b>Unge blader.</b> 2 håndfulle knuses og blandes med 3 L vann. Løsningen filtreres. Knus 1/3 kg hirse, og bland dette med den filtrerte løsningen. Drikk 2 glass nr 8 hver dag i 3 dager.

## 7. Resultater fra feltarbeid i Mali

Fotigui Dagnoko 39 år	Falakonon	Lærling hos sin far	Styrkende	<b>Små blader.</b> En stor mengde blader kokes i ”canary” med 5 – 6 L vann i 1 time. I L av dekoktet drikkes; 1 glass nr 8 hver dag til det er tomt. Resten brukes til å ta bad i.
N’Zan Sangaré 46 år	Foukala	20 pasienter per dag 6 års erfaring Har reist mye rundt i Mali og snakket med healere	”Leminimpo” (seksuelt overførbar sykdom i vagina)  Ødem   Indre sår	<b>Blad.</b> 3-4 bunter kokes med 2 L vann i 4 timer. Drikk ½ L hver morgen i 1 uke.  <b>Rot.</b> 2 håndfulle blandes med 1 L vann og trekkes ved romtemperatur i 3 dager. Drikk ½ L hver morgen i 1 uke.  <b>Rotbark.</b> Barken pulveriseres. Bland 1 ”3-fingerklype” i grøt hver morgen og spis dette i 1 uke.
Mamou Traoré (k) 55 år	Nizana	3-4 pasienter per dag 4 års erfaring  Spesialist i barne- sykdommer	Oppblåsthet og diaré hos småbarn   Malaria	<b>Unge blader.</b> Bladene knuses og 1 håndfull trekkes noen få minutter i ¼ L romtemperert vann. Løsningen filtreres og gis til barnet. Drikkes 1 gang daglig i 2 dager. Residivet tørkes i solen.  <b>Blad.</b> 1 bunt kokes i 2 L vann i 2 timer. Drikk ½ L av dekoktet, og ta dampbad og bad.

## 7. Resultater fra feltarbeid i Mali

Adama Sanogo 70 år	Adama- bougou, 5 km fra Falakono	10 pasienter per dag 20 års erfaring	Interne sår og blødninger  Eksterne sår	<b>Unge blader.</b> Knuses, tørkes og pulveriseres. 1 ”3-fingerklype” has i 1 glass nr 8 med vann eller grøt hver morgen og drikkes i 4 dager.  <b>Blad.</b> Pulveriseres og appliseres rett på skaden.
Tièblé Tioro 80 år	Dontiguila	Vet ikke hvor mange pasienter per dag Praktisert lenge Jobber også med andre ting	Beskytter mot onde ånder og andre onde ting, f.eks forgiftning	”Gui”. Pulveriseres og blandes med litt vann. Brukes til bad.
Korotoumo Ballo (k) 50 år	N’Pédjan	4 pasienter per dag	Nevrologisk malaria  Dysmenoré	”Gui”. Lag 2 L dekokt og drikk 2 håndfulle av dette 2 ganger daglig i 2-3 dager.  ”Gui”. Som ved malaria
Bafing Togola 55 år	Yiriba- bougou	7 pasienter per dag 10 års erfaring	Malaria og ikterus  Oppkast  Svie/ brennende følelse ved urinering	<b>Blad og stammebark.</b> 3 bladbunter og 2 håndfulle stammebark blandes i 2 L vann og kokes i 1 time. Drikk 1 glass nr 8 av dekoktet morgen og kveld i 3 dager.  <b>Blad og stammebark.</b> Som ved malaria.  <b>Blad og stammebark.</b> Som ved malaria.

## 7. Resultater fra feltarbeid i Mali

			Dysenteri	<b>Blad og stammebark.</b> Som ved malaria.
			Ikterus	<b>Rotbark.</b> Lag dekokt av rotbark. Bruk dekoktet til å lage hirsegrøt med. Drikkes.
			Oppkast, dysenteri, chaud pice	<b>Rotbark og blad.</b> I håndfull rotbark + blader. Dekokt. Drikk 1 glass nr 8 morgen og kveld i 3 dager.
			”Diamalla” (seksuell sykdom)	<b>Blad.</b> 3 bunter kokes i 3 L vann i 1 time. Drikk 1 glass nr 8 av dekoktet morgen og kveld.
Fatogoma Fomba 91 år	N’galla, 15 km fra Dioila	Vet ikke antall pasienter 60 års erfaring	Indre sår	<b>Blad.</b> Knuses, tørkes og pulveriseres. 3 ”3-fingerklyper” blandes i melk. Drikkes morgen og kveld inntil man er fornøyd med resultatet. X3
			Ødem	<b>Rot.</b> Samles inn, knuses og blandes med kalium. Appliseres morgen og kveld til man er fornøyd med resultatet.
			Nattlig feber hos småbarn	<b>Unge, røde blader.</b> Bladene pulveriseres, og 1 ”3-fingerklype” blandes i vann. Bruk denne løsningen til å vaske barnet.
			Feber	<b>Blad.</b> 1 bunt kokes lenge i ½ L vann. Dekoktet drikkes og benyttes til bad.

Salia Togola 70 år	Diana	5 pasienter per dag 30 års erfaring	Smerter i hele kroppen	<b>Blad.</b> 3 (4) bunter kokes i 4 L vann i 4 timer. Dekoktet brukes til bad i 3 dager.
--------------------------	-------	---	---------------------------	--

## 7.2 Innsamling av plantemateriale

Mesteparten av materialet av småbladet *C. glutinosum* ble samlet inn i Dioiladistriktet, men en bunt ble også kjøpt på medisinsplantemarkedet på Medinamarkedet. Alle de innsamlede bladene kom fra ett stort tre, noe som er uvanlig å finne.

Når det gjelder storbladet *C. glutinosum* ble det ikke samlet inn noe mer materiale. Det ble jobbet videre med tidligere ekstrakter.

## 8. KONKLUSJON

Målet med denne oppgaven var tredelt, og jeg vil i konklusjonen behandle hvert mål for seg.

**Mål 1: Struktur- og aktivitetsstudier av polysakkarider fra de store bladene hos *Combretum glutinosum* skulle videreføres fra tidligere studier.**

Arbeidet med de store bladene ble gjort på materiale som var preparert av Anne Marthe Ringerud (2003). Ringerud hadde gitt fraksjonen navnet Sur2, men i denne oppgaven ble det endret til CgLSur<sub>2</sub> for lettere å kunne skille mellom store og små blader. Fraksjonen ble først separert etter molekulstørrelse, noe som ga tre nye fraksjoner; CgLSur<sub>2</sub>I, CgLSur<sub>2</sub>II og CgLSur<sub>2</sub>III. Det ble deretter utført en rekke tester, flest på CgLSur<sub>2</sub>II på grunn av at det var lite stoff av de to andre fraksjonene.

### ***Karbohydratinnhold og biologisk aktivitet***

Metanolyse og GC viste at alle fraksjonene består av Ara, Rha, Xyl, Gal, Glc, Glc A og Gal A. Totalt karbohydratinnhold i de forskjellige fraksjonene er: CgLSur<sub>2</sub>I: 35,8% , CgLSur<sub>2</sub>II: 67,2% og CgLSur<sub>2</sub>III: 54,8%. CgLSur<sub>2</sub>III viser i tillegg et lavt innhold av Man. CgLSur<sub>2</sub>I inneholder spesielt mye Xyl mens CgLSur<sub>2</sub>II inneholder mye Gal A. Alle fraksjonene har et høyt innhold av Gal.

CgLSur<sub>2</sub>I og CgLSur<sub>2</sub>II har god aktivitet på komplementsystemet, omtrent samme som standarden *Plantago major*. Når det gjelder CgLSur<sub>2</sub>III kan det ikke sies noe om biologisk aktivitet da det skjedde en feil under testen og det ikke var nok materiale til å gjenta testen.

Etter enzymdegradering av CgLSur<sub>2</sub>II mistet fraksjonen sin komplementfikserende aktivitet, på tross av at fraksjonen inneholdt svært mye karbohydrat (92,4%). Dette kan tyde på at aktiviteten ikke sitter i de forgrenede områdene, men i noen sidekjeder som ble fjernet ved enzymbehandling.

CgLSur<sub>2</sub>I og CgLSur<sub>2</sub>II ble testet for innhold av metyl- eller acetylforestrede sukre, noe som resulterte i positivt resultat for begge. Forestring i CgLSur<sub>2</sub>II ble i tillegg konfirmert ved IR-spektroskopi.

Hos begge fraksjonene (CgLSur<sub>2</sub>I og CgLSur<sub>2</sub>II) kom store deler av materialet ut utenfor standardkurven, og det er derfor ikke mulig å si noe mer konkret om molekylvektene enn at de er større enn molekylvekten til den mest høymolekylære standarden, nemlig 475 kDa, og at CgLSur<sub>2</sub>II har laveste molekylvekt på 300 kDa.

### ***Strukturoppklaring***

CgLSur<sub>2</sub>I utmerker seg med et svært høyt innhold av T Xyl, som sammen med 1,4 Glc tyder på høyt innhold av xyloglukaner. I tillegg er det sannsynlig at fraksjonen inneholder arabinogalaktan II, sterkt forgrenet homogalakturonan og muligens rhamnogalakturonan II.

CgLSur<sub>2</sub>II inneholder sannsynligvis en del homogalakturonan som er mindre forgrenet enn i CgLSur<sub>2</sub>I, xyloglukaner og xylaner, rhamnogalakturonan I og arabinogalaktan II, samt muligens rhamnogalakturonan II. Etter enzymatisk degradering er den største forskjellen at det har blitt færre forgreningspunkter, noe som kan være en forklaring på bortfall av komplementfikserende aktivitet. Mulig lavere innhold av rhamnogalakturonan kan også være av betydning.

CgLSur<sub>2</sub>III inneholder strukturer som tyder på homogalakturonankjeder med lav forgreningsgrad, xylaner og xyloglukaner og arabinogalakturonan II, samt muligens rhamnogalakturonan II.

Det ble kun funnet spormengder av nativt metylerte forbindelser i CgLSur<sub>2</sub>II i form av 2-OMe Ara og 2-OMe Xyl, og ikke noe i de to andre fraksjonene.

**Mål 2: Isolering og karaterisering av polysakkarider fra de små bladene hos *Combretum glutinosum* skulle utføres og resultatene skulle sammenliknes med resultater som var oppnådd hos de store bladene.**

Tørket plantemateriale ble først ekstrahert med organiske løsemidler, og deretter med vann. Det ble i denne oppgaven jobbet med 50- og 100-graders vannekstrakter. 50-graders ekstraktet ble separert på ionebytterkolonne til de tre fraksjonene CgS50N, CgS50A og CgS50AA. 100-graders ekstraktet ble først separert på gelfiltreringskolonne, og deretter på



ionebytter som ga tre fraksjoner. Videre analyser ble utført på CgS50N, CgS50A, CgS100N, CgS100A og CgS100AA.

### ***Karbohydratinnhold og biologisk aktivitet***

Metanolyse og GC viste at alle fraksjonene består av Ara, Rha, Xyl, Man, Gal, Glc, Glc A og Gal A. Totalt karbohydratinnhold i de forskjellige fraksjonene er: CgS50N: 63,9%, CgS50A: 58,1%, CgS100N: 21,9%, CgS100A: 57,6% og CgS100AA: 31,3%. CgS50N inneholder spesielt mye Xyl mens CgS50A og CgS100A inneholder mye Gal. CgS100N er den fraksjonen som inneholder mest Ara. Alle fraksjonene inneholder mye Gal A og en del Glc.

CgS50N, CgS50A, CgS100N, CgS100A og CgS100AA har alle god aktivitet på komplementsystemet. CgS50N viser signifikant bedre aktivitet enn *Plantago major* ved lave konsentrasjoner mens de fire andre fraksjonene har omtrent samme aktivitet som standarden.

Etter enzymdegradering på CgS50N, CgS50A og CgS100A mistet fraksjonene sin komplementfikserende aktivitet. Undersøkelse av karbohydratinnhold viste at dette var svært lavt, noe som kan være årsaken til bortfallet av den komplementfikserende aktiviteten. Det er vanskelig å si om reduksjonen i karbohydratinnhold skyldes enzymbehandlingen og /eller tap av stoff under metanolyseprosessen.

CgS50N, CgS50A, CgS100N, CgS100A og CgS100AA ble testet for innhold av metyl- og acetylforetrede sukre, noe som resulterte i positive resultater for alle. Forestring ble i tillegg konfirmert ved IR-spektroskopi for fraksjonene CgS50N, CgS50A og CgS100A.

Alle fraksjonene CgS50N, CgS50A, CgS100A og CgS100AA er høymolekylære i området fra 20 kDa og oppover. Hos alle fraksjonene kom store deler av materialet ut utenfor standardkurven, og det er derfor ikke mulig å si noe mer konkret om øvre molekylvekter enn at de er større enn molekylvekten til den mest høymolekylære standarden, nemlig 475 kDa. Hele CgS100AA kom ut i voidvolumet, og er derfor mer høymolekylær enn de andre.

### ***Strukturoppklaring***

CgS50N ser ut til å inneholde xyloglukaner og muligens xylaner, sterkt forgrenet homogalakuronan, rhamnogalakuronan I, samt muligens arabinogalaktan II og rhamnogalakuronan II. Etter enzymatisk degradering ser fraksjonen ut til muligens å kunne

inneholde små mengder homogalakturonan med lite forgreninger, xyloglukaner, stivelse eller forurensning samt arabinogalaktan I.

CgS50A inneholder sannsynligvis homogalakturonankjeder med forgreninger, rhamnogalakturonan I og/eller II, xyloglukaner, arabinogalaktan II og muligens xylaner. Etter enzymatisk degradering var det svært lite karbohydrat i fraksjonen, noe som gir usikre resultater. Fraksjonen ser ut til muligens å kunne inneholde små mengder lite forgrenet homogalakturonan, xyloglukaner, stivelse eller forurensning, rhamnogalakturonan I og/ eller II, samt arabinogalaktan II.

CgS100N inneholder sannsynligvis også homogalakturonan, rhamnogalakturonan I, arabinogalaktan II og xyloglukaner, samt muligens rhamnogalakturonan II.

CgS100A inneholder sannsynligvis mye homogalakturonan som ikke er så veldig forgrenet, rhamnogalakturonan I, xyloglukaner og muligens rhamnogalakturonan II. Etter enzymatisk degradering var det svært lite karbohydrat i fraksjonen, noe som gir usikre resultater. Fraksjonen ser ut til muligens å kunne inneholde små mengder xyloglukaner, stivelse eller forurensning og arabinogalaktan II.

CgS100AA ser ut til å inneholde sterkt forgrenede homogalakturonankjeder, rhamnogalakturonan I, xyloglukaner samt muligens arabinogalaktan II og rhamnogalakturonan II.

For alle de enzymdegraderte fraksjonene gjelder det at de har mistet mange av elementene i strukturer som har vist å ha biologisk aktivitet. Dette kan, sammen med det lave karbohydratinnholdet, være årsak til bortfallet av komplementfikserende aktivitet. Små karbohydratmengder gir en enstra stor usikkerhet, noe som også må tas i betraktning.

### ***Sammenlikning av store og små blader***

Når det gjelder å skulle sammenlikne struktur- og aktivitetsforhold hos store og små blader fortøner dette seg vanskelig i og med at utgangsmaterialet er preparert litt forskjellig. Mange av analysene er dessuten foretatt kun én gang slik at det foreligger mye usikkerhet rundt dem. Jeg vil likevel komme med noen mulige forskjeller basert på egne resultater og resultater fra Ringerud 2003.

- Etter enzymatisk degradering mistet alle de behandlede fraksjonene sin komplementfikserende aktivitet. Undersøkelse av karbohydratinnhold viste at fraksjonen fra de store bladene hadde et mye høyere innhold enn fraksjonene fra de små. Hos Ringerud (2003) sank aktiviteten hos alle fraksjoner (fra store blader) med unntak av én, uten større endringer i karbohydratinnhold. Disse resultatene kan tyde enten på at polysakkaridene i fraksjonene fra store og små blader reagerer forskjellig på enzymdegradering eller at det har skjedd noe feil under testen med de små bladene. Det kan også muligens spille en rolle at det ble benyttet noe ulike enzymer.
- Det er funnet spor av noe som kan være 1,3' apiose hos de store bladene, men ikke de små. Det ble også funnet noen nativt metylerte forbindelser i en av fraksjonene fra store blader; dette ble ikke funnet hos noen av de små
- Begge bladtypene inneholder forestrede sukre.
- Råekstraktet for 50-graders fraksjonen inneholder større mengde galakturonsyre hos de store bladene enn hos de små.
- Etter ionebytterkromatografi ses store forskjeller på arabinose, xylose og galakturonsyre. For de små bladene inneholder den nøytrale fraksjonen mer xylose og galakturonsyre, men mindre arabinose enn hos de store bladene. Dette kan tyde på mer forestret galakturonsyre og xyloglukaner i fraksjonen fra de små bladene, og mer arabinogalaktaner i fraksjonen fra de store. Til gjengjeld kommer mer xylose ut i sure fraksjoner hos de store bladene. De sure fraksjonene fra de store bladene har et høyere karbohydratinnhold enn fraksjonene fra de små.
- Begge 50-graders råekstraktene viser god komplementfikserende aktivitet. Noe høyere for de små bladene ved lave konsentrasjoner.

**Mål 3: Det skulle gjennomføres feltarbeid i Mali for å intervjuere healere om deres kunnskaper og bruk av planten, om evt om det var forskjellig bruk av store og små blader, innen den tradisjonelle medisinen.**

Det ble utført feltarbeid i to områder i Mali for å skaffe informasjon om bruk av *C. glutinosum* i tradisjonell medisin. I Kolokani ble 16 healere intervjuet, og alle benytter *C. glutinosum* i sin praksis. Det ble nevnt 27 indikasjoner, og de hyppigst nevnte var diare/dysenteri, malaria og feber. To healere anvender også ”gui” fra *C. glutinosum*;

parasittvekster fra *Lorathacea*-familien. I Dioila ble det intervjuet 29 healere, og alle disse benytter også *C.glutinosum*. I tillegg benytter 11 healere ”gui”. 44 indikasjoner ble nevnt, hyppigst nevnt var malaria og sår.

Hele planten benyttes; blader, rot og bark, og det tilberedes som oftest et dekokt som drikkes. Dekokt benyttes også ofte til bad. Andre vanlige administrasjonsformer-/måter er inhalasjon av røyk eller damp, plantemateriale blandet med karitesmør smøres på huden, pulverisert materiale som blandes i vann og smøres på huden.

To av de intervjuede healerene i Dioila og en i Kolokani nevnte spesifikt små blader til noen indikasjoner (oppblåst mage, hjerte-/pust-/brystproblemer, styrkende) men ellers ble det bare brukt blader eller unge blader.

## 9. LISTE OVER REAGENSER

Amboceptor 9020	Virion
Ammoniakk (NH <sub>3</sub> )	Merck
Bovine Serum Albumin (BSA), 30%	ICN Biomedicals
Dekstraner	Pharmacia
Diklormetan (DCM, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	Merck
Dimetylsulfoksid (DMSO)	Merck
Eddiksyre (CH <sub>3</sub> COOH)	Prolabo
Eddiksyre p.a (iseddik)	Prolabo
Eddiksyreanhydrid	Merck
Endo-POLYGALACTURONANASE	Megazyme
Erytrocytter	Folkehelseinstituttet, sau "Hvit 120" og "Hvit 122"
Etanol	Merck/Farmasøytisk institutt
Fenol	Merck
Heliumgass	AGA
Heksametyldisilazan (HMDS)	Aldrich
Imidazole	Sigma
Iodmetan (metyljodid)	Fluka
Isopropanol	Arcus produkter
Kaliumbromid (KBr)	Fluka
Kloroform	Prolabo
Komplement	ECG, Folkehelseinstituttet
Koppersulfat (CuSO <sub>4</sub> )	Merck
Mannitol	Sigma
MES	Sigma
Metanol (CH <sub>3</sub> OH)	BDH/Merck
Metanol, vannfri	Merck
1-Metylimidazol	Fluka
Natriumacetat	Riedel-de-Haen
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Merck
Natrimborodeuterid (NaBD <sub>4</sub> )	Aldrich
Natriumhydroksid pellets (NaOH)	Merck
Natriumklorid (NaCl)	Prolabo
Natriumtiosulfat-pentahydrat (Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> )	Merck
Nitrogengass	AGA
Oktanol	Merck
PMII fra Plantago major	Anne Berit Samuelsen
Pyridin, vannfri	Merck
Saltsyre (HCL), konsentrert	Prolabo
Svovelsyre (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ), konsentrert	Merck
Sølvnitrat (AgNO <sub>3</sub> )	Merck
Toluen	Prolabo
Trifluoreddiksyre (TFA)	Merck
Trimetylklorasilan (TMCS)	Supelco
TRIZMA	Sigma
Veronalbuffer (CFT, pH 7,2)	Folkehelseinstituttet

## 10. REFERANSER

**Ancolio, C., Azas, N., Mahiou, V., Ollivier, E., Di Giorgio, C., Keita, A., Timon-David, P., Balansard, G. (2002).** Antimalarial activity of extracts and alkaloids isolated from six plants used in traditional medicine in Mali and Sao Tome. *Phytotherapy Research* (2002), 16(7), 646-649.

**Angeha, J.E., Huangb, X., Sattlerb, I., Swana, G.E, Dahseb, H., Härtlb, A, Eloffa, J.N. (2006)** Antimicrobial and anti-inflammatory activity of four known and one new triterpenoid from *Combretum imberbe* (Combretaceae) *Journal of Ethnopharmacology* 2006 Sep 8.

**Aspinall, G.O. (1973)** Carbohydrate polymers of plant cell walls. Loewus, F.A (Ed) *Biogenesis of cell wall polysaccharides*. Academic Press, New York, s 99.

**Asres K, Bucar F. (2005)** Anti-HIV activity against immunodeficiency virus type 1 (HIV-I) and type II (HIV-II) of compounds isolated from the stem bark of *Combretum molle*. *Ethiop Med J.* 2005 Jan;43(1):15-20.

**Baba-Moussaa,F., Akpaganab, K., Boucheta P. (1998).** Antifungal activities of seven West African Combretaceae used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, Volume 66, Issue 3, September 1999, Pages 335-338.

**Bah, S. (2002)** Knowledge and practices of herb-herb and herb-conventional drug interactions among traditional practitioners in Bamako, Mali. Masteroppgave i internasjonal helse. Universitetet i Oslo.

**Bidwell, R.G.S (1974).** The Cell. *Plant Physiology*. Macmillan Publishing Co, USA, s 42-69

**Bio-Rad Laboratories (2000).** *Bio-Gel P Polyacrylamide Gel. Instruction Manual*.

**Boullard, B. (2001).** *Plant médicinales du monde*. Éditions ESTEM, Paris, s. 150-151.

**Bruneton, J. (1995).** *Polysaccharides. Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*. Intercept Ltd, Andover, England, s 33-35.

**Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R.L. (2000).** The Cell Wall. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Biologists, John Wiley & Sons, UK, s 53-54.

**Burkill, H.M. (1985)** The useful Plants of West Tropical Africa, 2. edition, 1 (fam A-D), Royal Garden, Kew, s 397-398.

**Capek, P., Hříbalová, V., Svandová, E., Ebringerová, A., Sasinková, V. and Masarová, J. (2003).** Characterization of immunomodulatory polysaccharides from *Salvia officinalis* L. *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 33, Issues 1-3, November 2003, s 113-119.

**Ciucanu, I., Kerek, F. (1984).** A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research* 131 s 209-217.

**Complex Carbohydrate Research Center**, <http://www.ccrc.uga.edu/~mao/rg2/intro.htm>

**Diallo, D., Paulsen B.S. (2000).** Pharmaceutical research and traditional practitioners in Mali: Experiences with benefit sharing. *Responding to bioprospecting. From biodiversity in the South to medicines in the North*. Svarstad, H. og Dhillon, S.S (ed). Spartacus forlag AS, Oslo 2000, s 133-144.

**Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K, Rebers, P.A., Smith, F. (1956).** Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356.

**Expert reviews**, nettside, <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/03006288h.htm>

**Fang, X., Jiang, B., Wang, X. (2006).** Purification and partial characterization of an acidic polysaccharide with complement fixing ability from the stems of *Avicennia marina*. *J Biochem Mol Biol*. 2006 Sep 30;39(5):546-55.

**Fenwick, S. (1998).** Bioprospecting og biopiracy? *DDT* Vol 3, 9.september 1998.

**Fyhrquist, P., Mwasumbi, L., Haeggstrom, C-A., Vuorela, H., Hiltunen, R., Vuorela, P. (2002).** Ethnobotanical and antimicrobial investigation on some species of *Terminalia* and *Combretum* (Combretaceae) growing in Tanzania. *Journal of ethnopharmacology* (2002), 79(2), 169-77.

**Geyid, A., Abebe, D., Debella, A., Makonnen, Z., Abera, F., Teka, F., Kebede, T., Urga, K., Yersaw, K., Biza, T., Mariam, B.H., Guta, M. (2005).** Screening of some medicinal plants of Ethiopia for their anti-microbial properties and chemical profiles. *Journal of Ethnopharmacology* (2005), 97(3), 421-427.

**Hansen, M.H. (2000)** *Sårhelende planter i Mali. Screening av flere planter og videre studier av struktur og aktivitet i polysakkarider fra Combretum glutinosum*, Universitetet i Oslo, 2000

**Heinrich, M. (2003).** Ethnobotany and Natural Products: The Search for New Molecules, New Treatment of Old Diseases or a Better Understanding of Indigenous Cultures. *Medicinal Chemistry* 2003, 3, 141-151

**Karou, D., Dicko, M.H., Simporé, J., Traore, A.S. (2005).** Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. *African Journal of Biotechnology* - ONLINE (2005), 4(8), 823-828.

**Inngjerdingen, K.T., Debes, S.C., Inngjerdingen, M., Hokputsa, S., Harding, S.E., Rolstad, B., Michaelsen, T.E., Diallo, D., Paulsen, B.S. (2005).** Bioactive pectic polysaccharides from *Glinus oppositifolius* (L.) Aug. DC., a Malian medicinal plant, isolation and partial characterization. *J Ethnopharmacol*. 2005 Oct 3;101(1-3):204-14.

**Investir en zone franc** (kart over Mali)  
<http://www.izf.net/izf/Documentation/Cartes/Pays/supercartes/mali.htm>

**Lea, T. (2000):** Løselige molekyler og naturlig immunitet. *Basal og klinisk immunologi: prinsipper og molekylære mekanismer*. Fagbokforlaget, Bergen s. 25-39.

**Johnson, A.W (1999):** *Invitation to Organic Chemistry*. Jones and Bartlett Publishers, USA, s 153.

**Jossang, A., Poussset, J-L., Bodo, B. (1994).** Combreglutinin, a hydrolyzable tannin from *Combretum glutinosum*. *Journal of Natural Products* (1994), 57(6), 732-7.

**Kim, J-B., Carpita, N.C. (1992).** Changes in Esterification of the Uronic Acid Groups of Cell Wall Polysaccharides during Elongation of Maize Coleoptiles. *Plant Physiology*, 98, 646-653.

**London South Bank University**, <http://www.lsbu.ac.uk/water/hycl.html>

**Lundanes, E. (1994).** Koplinger med MS. *Kromaografi*, 3.utgave. Greibrokk, T., Lundanes E. og Rasmussen KE, Universitetsforlaget AS, Aurskog, Norge s 266-264.

**McGaw, L.J., Rabe, T., Sparg, S.G., Jager, A.K., Eloff, J.N., van Staden, J. (2001).** An investigation on the biological activity of *Combretum* species. *Journal of ethnopharmacology* (2001), 75(1), 45-50.

**Michaelsen, T.E., Gilje, A., Samulesen, A.B., Høgåsen, K., Paulsen, B.S. (2000).** Interaction between human complement and pectin type polysaccharide fraction, PMII, from leaves of *Plantago major* L. *Scand J Immunol*. 2000 Nov;52(5):483-90.

**Molecular Expressions**, <http://micro.magnet.fsu.edu/cells/plants/cellwall.html>

**Nergard, C.S., Kiyohara H., Reynolds J.C., Thomas-Oates J.E., Matsumoto T., Yamada H., Patel T., Petersen D., Michaelsen T.E., Diallo D., Paulsen B.S. (2006).** Structures and structure-activity relationships of three mitogenic and complement fixing pectic arabinogalactans from the malian antiulcer plants *Cochlospermum tinctorium* A. Rich and *Vernonia kotschyana* Sch. Bip. ex Walp. *Biomacromolecules*, 2006 Jan;7(1):71-9.

**Nguyen, M.T.T., Awale, S., Tezuka, Y., le Tran, Q., Watanabe, H., Kadota, S. (2004).** Xanthine oxidase inhibitory activity of vietnamese medicinal plants. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* (2004), 27(9), 1414-1421.

**Ouattara, Y., Sanon, S., Traorè, Y., Mahioud, V., Azas, N., Sawadogo L. (2006)** Antimalarial activity of *Swartzia madagascariensis* Desv. (Leguminosae), *Combretum glutinosum* Guill. & Perr. (Combretaceae) and *Tinospora bakis* (Menispermaceae), Burkina Faso medicinal plants. *Afr. J. Trad CAM* (2006) 3 (1): 75-81.

**Paulsen, B.S., Barsett, H (2005).** Bioactive Pectic Polysaccharides. *Adv Polym Sci* (2005) 186: 69-101.

**Pedersen-Bjergaard, S. (1999).** *Spektroskopiske metoder for legemiddelanalyse*. Kap 3 IR-spektroskopi, s 32-35.

**Rasmussen, K.E. (1994)** *Kromatografi*, 3.utgave. Greibrokk, T., Lundanes E. og Rasmussen K.E., Universitetsforlaget AS, Aurskog, Norge, s 109 – 153.



- Ringerud, A.M. (2003)** *Sårhelende planter i Mali. Struktur- og aktivitetsstudier av polysakkarider fra Combretum glutinosum*, Universitetet i Oslo, 2003.
- Rogers, C.B., Verotta, L. (1996).** Chemistry and biological properties of the African Combretaceae. Hostettman, K., Chinyanganya, F.C., Maillard, M., Wolfender, J.-L. (Red.) *Chemistry, biological and pharmacological properties of African medicinal plants*. University of Zimbabwe Publications, Zimbabwe, kap 6, s 121-141.
- Pharmacia LKB Biotechnology (1990).** *Gel filtration, Theory and practice*. Trykk: Rahms i Lund, Sverige, s 6, 14-1946.
- Pharmacia Fine Chemicals (1983-3).** Ion Exchange Chromatography. Principles and methods. Rahms, Lund. S 3-7, 43.
- Rose, J.K.C (2003).** *The plant cell wall*. Blackwell Publishing Ltd, CRC Press, s 3.
- Salisbury, F og Ross, C (1969)** *Plant physiology*. Wadsworth Publishing Company, Inc., California, s 236 – 251.
- Samuelsson, G (1999).** *Drugs of natural origin*, 4. ed, Swedish Pharmaceutical Society, Swedish Pharmaceutical Press, Sverige, s 114.
- Soejarto, D.D. (1996).** Biodiversity prospecting and benefit-sharing: perspectives from the field. *Journal of Ethnopharmacology*, 51 (1996), 1-15.
- Spectrum Laboraories Inc (2005).** *Spectrum Product Insruction Manual*, Spectra Por®, følgehefte.
- Sturgeon, R.J. (1990).** Colorimetric assay. *Methods in Plant Biochemistry, vol 2, Carbohydrates*. Dey, P.M og Harborne J., B (red). Academic Press, London, s 4.-6.
- Taiz, L og Zeiger, E (1991).** Plant and Cell Architecture. *Plant Physiology*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., California, s 7, 22.
- Taiz, L og Zeiger, E (1998).** Plant and Cell Architecture og Cell Walls: Structure, Biogenesis and Expansion. *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, USA, s 9, 411-424.
- Taiz, L og Zeiger, E (2002)** Cell Walls: Structure, Biogenesis and Expansion. *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, USA, s 322-327.
- USDA** (United States departement of Agriculture)  
<http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=profile&symbol=Magnoliophyta&display=31>
- USGS**, International Program, <http://edcintl.cr.usgs.gov/senegal2/veg7.html>
- Westereng B., Yousif O., Michaelsen T.E., Knutsen S.H., Samuelsen A.B (2006).** Pectin isolated from white cabbage - structure and complement-fixing activity. *Mol Nutr Food Res*. 2006 Aug; 50(8):746-55.

**Wikipedia**, <http://en.wikipedia.org/wiki/Combretum>

**Wikipedia**, <http://en.wikipedia.org/wiki/Mali>

**Wikipedia**, <http://en.wikipedia.org/wiki/Polysaccharide>

**Yamada, H., Kiyohara H. (1999).** Complement-activating polysaccharides from medicinal herbs. *Immunomodulatory Agents from Plants*. Wagner H (Ed.). Birkhauser Verlag Basel, Sveits, s 161-202.